

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la proteína *F-box* SKP2A de
Arabidopsis thaliana en la división celular y
en la respuesta a auxina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Silvia Jurado Sánchez

Bajo la dirección del doctor:

Juan Carlos del Pozo Benito

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-3183-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Estudio de la proteína *F-box* SKP2A de
Arabidopsis thaliana en la división celular y en
la respuesta a auxina

TESIS DOCTORAL
SILVIA JURADO SÁNCHEZ
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de la proteína *F-box* SKP2A de
Arabidopsis thaliana en la división celular y en
la respuesta a auxina



SILVIA JURADO SÁNCHEZ

Madrid, 2009

Memoria presentada por D^a Silvia Jurado Sánchez, Licenciada en
Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid.

Director

Dr. Juan Carlos del Pozo Benito

Tutor

Dr. Manuel Díez Sancho

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA)

Madrid, 2009

Fdo: Dr. Juan Carlos del Pozo Benito

*A mis padres
y a Sandra*

Que la vida iba en serio
Uno lo empieza a comprender más tarde
-Como todos los jóvenes, yo vine
a llevarme la vida por delante.

Jaime Gil de Biedma y Alba. 1968

**“No western,
no party!”**

Estos han sido los mejores años de mi época de “estudiante”, y por ello tengo mucho que agradecer a las personas que me han acompañado en este camino. No es posible nombrarlas a todas, por lo que espero que me perdonen aquellos a los que no pueda poner en estas líneas.

En primer lugar quiero agradecer a Miguel por esa llamada que no esperaba, a Nerea por su alegría y por enseñarme y apoyarme en los comienzos, y al laboratorio de Crisanto Gutiérrez, que nos acogió tan bien y que para mí fue el primer contacto que tuve con este mundillo de la ciencia. A Sara Díaz por compartir parte su trabajo conmigo y por su tesis (y la de Pablo) que tanto me han inspirado para escribir la mía.

A mis compañeros del INIA que han sido mi familia durante la mayor parte de este trabajo. A Gemita por sus canciones, su buen humor y por ser tan buena persona. A los laboratorios de Manolo, Jarillo, Rosa y Salinas (Rafa, Carlitos e Iñaki) con los que hemos compartido protocolos y cañas, y en especial: A Leti por los *telares*, los *malagusto*, por ser la más guapa y la más alta, y porque sin tus angustias en las comidas esto no hubiera sido lo mismo (¡y que todo el mundo sepa que Astorga está en León!). A Ana L. por tener siempre una respuesta para mí, a Lauri por ser un pilar en los malos momentos y por los paseos por la calle de la Cruz, y a Angelita porque ser un soplo de aire fresco, por contagiarnos con tu alegría, y por ¡¡¡*Que gane la mejor!!!*. Junto con Conchi, vosotras siempre seréis mis niñas del Z.

Por supuesto, sin mi laboratorio nada de esto hubiera sido posible. Por ello debo dar las gracias a todos los que habéis formado parte de él en algún momento (Vicky, Karina, Ana-Huski, Claudia), y sobre todo a Conchi, mi hermanita de tesis, por levantarme en muchos momentos de desánimo, y por aguantar mis *¡no puedo, no puedo!*, entre otras cosas. A Gema por ser un espejo personal y profesional donde mirarme, por poder con todo siempre con una sonrisa. A Zamira por su fuerza y por ser tan cabezota y querer hacerlo todo bien, y a Sara porque aunque ha sido poco, parece que hubieras estado aquí desde siempre. Por último, tengo mucho que agradecer a Carlos, por ser uno de esos raros casos en los que la calidad científica y humana van de la mano, por enseñarme y por hacer que todo parezca fácil, por tu paciencia infinita y sobre todo por lo comedido de tus enfados. Gracias *papa*.

A Luis F. Pacios por su esfuerzo en la modelización de SKP2A. A la generación CBGP (Sandra, Julieta y Nacho), a los que siempre tuvisteis un boli-pipeta-timer para mí, y a los que os apuntáis en la reveladora, mil gracias.

Y como una Tesis no acaba cuando uno cruza la puerta del laboratorio, debo dar las gracias también a mi familia y a mis amigos por sus ánimos y por aguantar mi mal humor. Gracias a mis padres por su amor, su paciencia y por ser los mejores padres del mundo (y por habernos comprado ese Microcefa y Quimicefa a riesgo de hacer estallar la casa). A Sandra por ser tan brillante aquí como al otro lado del charco, por su cariño y por enseñarme que los ácidos y las bases no se mezclan. A Juan Pedro por ser la razón de mi alegría, por su apoyo incondicional y por haberse leído esta tesis llena de siglas raras. Aunque no entendáis una sola palabra, en cada espacio en blanco para vosotros hay un *os quiero*.

Índice

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1	LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA.....	1
1.2	LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA: LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL EN PLANTAS.....	4
1.2.1	La auxina.....	11
1.2.2	El ácido jasmónico.....	12
1.2.3	El etileno.....	12
1.2.4	Las giberelinas.....	13
1.2.5	El ácido abscísico.....	14
1.3	LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA EN OTROS ORGANISMOS.....	15
1.4	CICLO CELULAR EUCARIOTA.....	16
1.5	EL SISTEMA RADICULAR. DESARROLLO DE RAÍCES LATERALES.....	21
1.6	EL ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS.....	26
1.7	<i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA RUTA DE LA UBIQUITINA EN PLANTAS.....	29

2. OBJETIVOS.....31

3. MATERIALES.....32

3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
3.2	MEDIOS DE CULTIVO.....	32
3.3	VECTORES.....	33
3.4	OLIGONUCLEÓTIDOS.....	34
3.5	ANTICUERPOS.....	34
3.6	SOLUCIONES Y TAMPONES.....	34
3.7	OTROS REACTIVOS.....	35

4. MÉTODOS.....37

4.1	AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	37
4.2	CONDICIONES DE CULTIVO.....	38
4.3	PLANTAS SOBREEXPRESORAS Y TRANSGÉNICAS.....	38
4.4	TINCIÓN HISTOQUÍMICA GUS.....	39
4.5	CULTIVOS DE CÉLULAS SINCRONIZADAS.....	39
4.6	ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN.....	40
4.7	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	40
4.8	ENSAYOS DE ACTIVIDAD E3 UBIQUITÍN-LIGASA.....	41
4.9	ENSAYOS DE <i>LACZ</i> E <i>HIS3</i>	42

4.10	TRATAMIENTOS DE PLÁNTULAS DE ARABIDOPSIS CON AUXINAS, ABA Y NACL.....	42
4.11	ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.....	43
4.12	TRADUCCIÓN <i>in vitro</i>	43
4.13	MEDIDAS DE LOS PRIMORDIOS DE LAS RAÍCES LATERALES.....	44
4.14	TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO.....	44
4.15	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	44
4.16	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	45
4.17	INMUNOLocalización de proteínas.....	45
4.18	ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS EN AUSENCIA DE FOSFATO.....	45
4.19	ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN AUSENCIA DE SACAROSA Y MANITOL.....	46
4.20	ENSAYOS DE RESISTENCIA A LA TEMPERATURA.....	46
4.21	MEDIDA DE LA LONGITUD DEL HIPOCOTILO.....	46
4.22	ENSAYO DE UNIÓN A AUXINA Y COMPETICIÓN CON AUXINA FRÍA, α NAA Y β NAA.....	47
5.	RESULTADOS	
5.1	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SKP2A	
5.1.1	Expresión espacio-temporal.....	52
5.1.2	Expresión durante el ciclo celular.....	53
5.1.3	Estudio de la función de <i>SKP2A</i>	54
5.2	SKP2A ES UNA PROTEÍNA NUCLEAR	55
5.3	SKP2A ESTIMULA LA DIVISIÓN CELULAR EN LOS MERISTEMOS.....	56
5.4	LA SOBREEXPRESIÓN DE <i>SKP2A</i> INDUCE LA FORMACIÓN DE PRIMORDIOS DE RAÍCES LATERALES	59
5.5	RESPUESTA DE <i>SKP2A</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS	
5.5.1	Crecimiento de la raíz principal de <i>SKP2A</i> en medio MS, NaCl y ABA.....	62
5.5.2	Función de <i>SKP2A</i> en la respuesta a un exceso de sacarosa.....	64
5.5.3	Función de <i>SKP2A</i> en la respuesta a un exceso de temperatura.....	66
5.5.4	<i>SKP2A</i> mantiene la división celular en condiciones de ausencia de fosfato.	67
5.6	SKP2A EN LA RUTA DE DEGRADACIÓN UBIQUITINA/ PROTEASOMA 26S	
5.6.1	SKP2A forma parte de un complejo SCF ubiquitina ligasa activo.....	71
5.6.2	SKP2A se degrada a través de la ruta ubiquitina/proteasoma 26S.....	73
5.6.3	SKP2A se modifica con ácido N-mirístico.....	75
5.7	ESTUDIO DE SKP2A EN LA RESPUESTA A AUXINA	
5.7.1	La auxina afecta al crecimiento y al desarrollo de la raíz de plantas que sobreexpresan SKP2A	75

5.7.2 La auxina regula la estabilidad de SKP2A	82
5.7.3 Unión de las auxinas a SKP2A	84
6. DISCUSIÓN.....	96
7. CONCLUSIONES.....	108
8. BIBLIOGRAFÍA.....	110

Abreviaturas y siglas

aa: aminoácido	MG132: N-benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal
ABA: Ácido abscísico	min: minuto
Ac: Anticuerpo	mRNA: ARN mensajero
At: <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP-40: Nonidet p40
ATP: Adenosina trifosfato	Pb: Pares de bases
AXR: Resistente a auxina	PBS: Tampón fosfato salino
CDKs: Kinasas dependientes de ciclinas	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CYC: Ciclina	PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo
DMSO: Dimetilsulfóxido	ARN: Ácido ribonucleico
ADN: Ácido desoxirribonucleico	RT-PCR: Retrotranscripción
DTT: 2,4- ditioreitol	S: Síntesis
EDTA: Ácido etilen-diamin-tetraacético	SCF: Skp/Culina/ <i>F-box</i>
GFP: Proteína verde fluorescente	SDS: Dodecil sulfato sódico
GST: S-glutation transferasa	SKP: Proteína asociada a kinasa de fase S
GUS: Beta-glucuronidasa	TE: Tris-EDTA pH 8.0
h: Hora	Tris: Trihidrometil aminometano
IAA: Ácido indol acético	WT: Fenotipo silvestre
IPTG: Isopropil-tiogalactopiranosido	X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucurónico
Kb: Kilobase	
kDa: Kilodalton	
M: Mitosis	

Nomenclatura

En esta tesis se han intentado evitar, en la medida de lo posible, el uso de expresiones inglesas. Sin embargo, con el fin de facilitar la lectura, se han conservado algunas como los nombres de técnicas (*western-blot*) o los acrónimos de ácidos nucleicos (cDNA, mRNA). En todos los casos las palabras en otros idiomas se han escrito en cursiva.

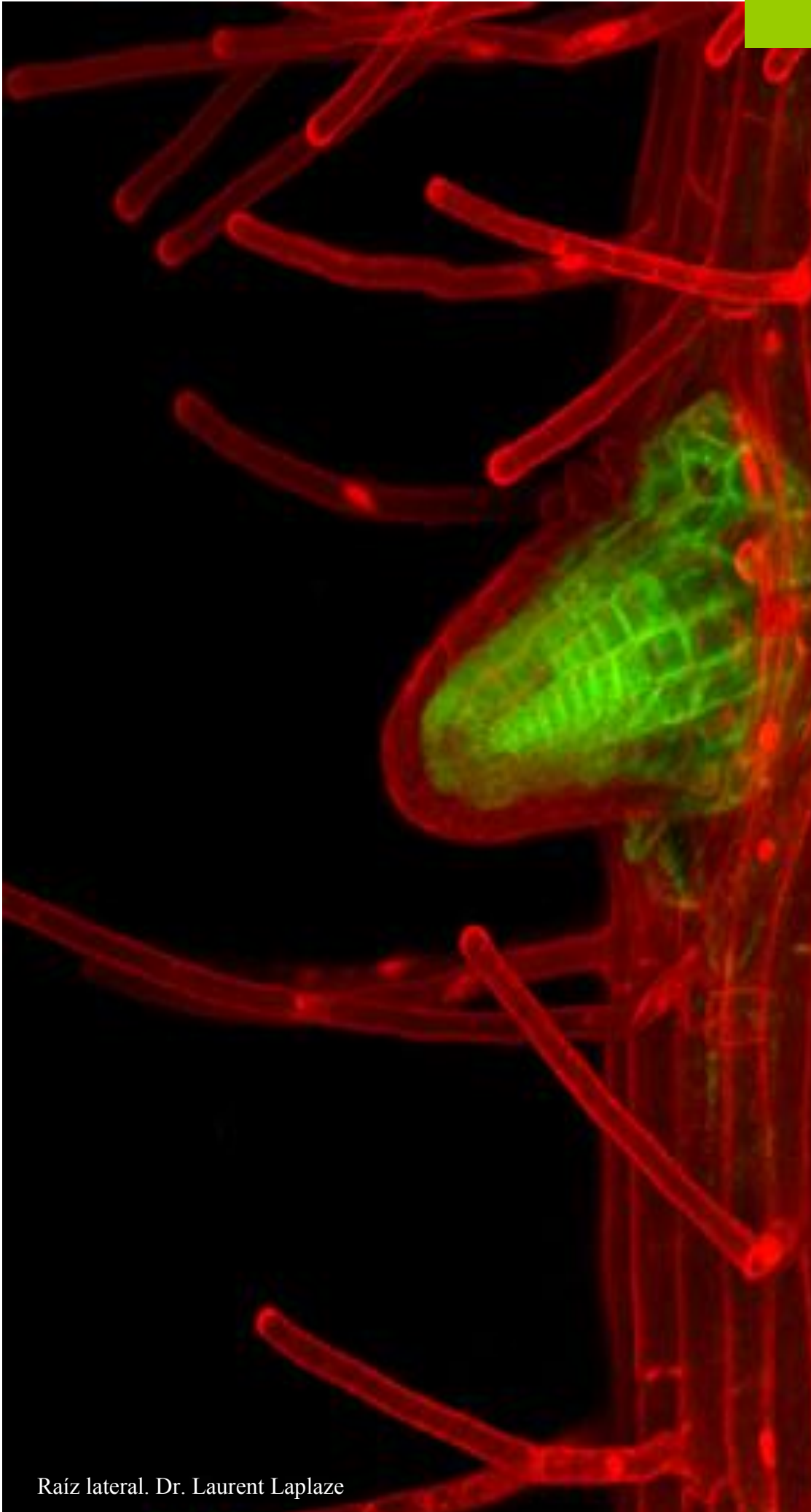
Resumen

Los altos niveles de coordinación entre la división y la diferenciación celular son claves para el correcto crecimiento y desarrollo. Uno de los mecanismos que permiten el control de la división celular es la proteólisis selectiva de reguladores clave, que en eucariotas se produce principalmente por la ruta degradativa ubiquitina/proteasoma 26S (UPS). En plantas, este complejo juega un papel fundamental en el control de muchos procesos del desarrollo, tales como la respuesta hormonal, la respuesta a diferentes estreses y la proliferación celular. En esta ruta se han identificado tres tipos de enzimas principales: activadoras de ubiquitina (E1), conjugadoras (E2) y ubiquitin-ligasas (E3). Uno de los tipos de E3 encontrados en plantas es el complejo SCF, que consta de 4 subunidades: CDC53 (CULINA1, o CUL1), RBX, SKP1 (ASK1 en plantas) y proteínas con un motivo-F. Estas últimas se caracteriza por poseer un lugar de reconocimiento del sustrato, por lo que confieren la especificidad al sistema. Aproximadamente el 5 % del total de las proteínas de *Arabidopsis thaliana* pertenece a la ruta del sistema UPS, por lo que la degradación dependiente de ubiquitina debe de ser un sistema regulador de gran importancia. En *Arabidopsis* se han encontrado dos genes, *SKP2A* y *SKP2B*, que codifican proteínas con alta homología a SKP2 de humanos, una *F-box* crucial en el control de la división celular. La proteína SKP2A es una proteína tipo *F-box* implicada en la regulación de la estabilidad de los factores transcripcionales E2FC-DPB, que funcionan en el control de la división celular. SKP2A es un regulador positivo de la división celular ya que actúa promoviendo la degradación del represor E2FC/DPB. Los datos bioquímicos han mostrado que SKP2A forma parte de un complejo SCF *in vivo* con actividad ubiquitin-ligasa, que la proteína SKP2A es regulada por ubiquitinación y se degrada a través del proteasoma, y que esta degradación es regulada por las auxinas. Datos bioquímicos han mostrado que SKP2A es capaz de unir directamente auxinas, convirtiéndolo en un nuevo receptor de esta hormona. Esto nos hace pensar también que la unión de las auxinas a la proteína SKP2A sea el mecanismo responsable de controlar su estabilidad. Asimismo, hemos observado que las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A presentan un mayor número de células en G2/M en los primordios, los niveles de ploidía están reducidos y un mayor número de primordios de raíces laterales. Con todos estos resultados, proponemos a *SKP2A* como un regulador positivo de la división celular cuya estabilidad está regulada por la respuesta a auxina.

Abstract

Coordination between cell division and cell differentiation is crucial for growth and development of eukaryotic organisms. Progression through the different phases of cell division requires the specific degradation of proteins through the ubiquitin-proteasome 26S pathway (UPS). In plants, this pathway plays a key role in controlling several developmental processes and responses, including cell proliferation. Ubiquitin is attached to target proteins in sequential biochemical cascade that involves the E1, E2 and E3 enzymes. There are different types of E3. One of these types is the SCF complex, which is composed of 4 protein subunits, CUL1, RBX, ASK1 and an *F-box*. The completion of the Arabidopsis genome sequence has allowed the identification of a large number of proteins involved in the Ub-pathway (approximately 5% of the total protein), suggesting that a large number of proteins might be regulated by ubiquitination. Regarding to the regulation of cell division, we have identified two *F-box* proteins, SKP2A and SKP2B, which share homology to human SKP2, a key regulator of cell division. SKP2A is an *F-box* protein that regulates the stability of the cell division E2FC-DPB transcription factor. SKP2A positively regulates cell division, at least, in part, by degrading the E2FC/DPB transcription repressor. SKP2A forms an SCF complex *in vivo* that has E3 ubiquitin ligase activity. Interestingly, SKP2A is degraded through the Ub/26S pathway and auxin regulates such degradation. We have also found that SKP2A binds directly to auxin, suggesting that this hormone may regulate the stability of SKP2A through direct binding. In addition, plants that over-express *SKP2A* increase the number of cells in G2/M, reduce the level of ploidy and develop higher number of lateral root primordia. Taken together, our results with indicate that SKP2A is a positive regulator of cell division and its stability is auxin-dependent.

1. INTRODUCCIÓN



1.1 LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA.

La ubiquitina (Ub) es un polipéptido de 76 aminoácidos que está altamente conservado en todos los organismos eucariotas. La modificación covalente de las proteínas diana con Ub, según sea monoubiquitinación o poliubiquitinación, está asociada a diferentes funciones en la célula, entre las que cabe resaltar el control de la progresión del ciclo celular, la biogénesis de orgánulos, la presentación de antígenos, la respuesta a estrés, la transducción de señales, el tráfico de proteínas, la reparación del ADN, la apoptosis, la regulación transcripcional y la degradación a través del sistema Ubiquitina/proteasoma 26S (UPS) (Pickart, 2001). La unión de la Ub a las proteínas diana se produce a través de una cascada enzimática que comprenden tres enzimas principales: La enzima activadora de ubiquitina o **E1**, las enzimas conjugadoras o **E2** y las ubiquitin-ligasas (**E3**). La enzima E1, en una reacción dependiente de ATP, forma un enlace tioéster a través de un residuo de cisteína con el extremo carboxilo terminal (C-t) de la ubiquitina para transferirla de forma activada a la enzima E2. La enzima E2 carga la ubiquitina activada previamente e interacciona con la E3, quien reconoce específicamente a la proteína diana. Finalmente, la ubiquitina se une covalentemente a la proteína diana a través de un residuo interno de lisina y el grupo C-t de la Ub. El marcaje con Ub de las proteínas diana puede ser de diferentes tipos: monoubiquitinación, poli-mono-ubiquitinación y poli-ubiquitinación. En este último encontramos un complejo sistema de ensamblaje de Ub, ya que la cadena de poli-Ub se puede formar usando la misma lisina, formando una cadena final, o usando diferentes lisinas dentro de la molécula de Ub, formando cadenas de estructura compleja. En cada caso, estas diferentes estructuras tienen diferentes implicaciones biológicas que van desde la degradación de la proteína hasta la activación de la misma, entre otras (Hershko y Ciechanover, 1998). Para que una proteína diana se degrade a través del proteasoma parece ser requisito indispensable que esté marcada con al menos 4 moléculas de ubiquitina, que se ensamblan a partir de la lisina K48 (Wilkinson *et al.*, 2000, Doherty *et al.*, 2002, Smalle y Viestra, 2004). El proteasoma 26S es un complejo enzimático formado por el proteasoma 20S, que contiene los lugares activos de proteólisis, y dos partículas reguladoras 19S compuesta de varias subunidades designada como RPT (*regulatory particle triple A-ATPase*) (Rubin *et al.*, 1998). Estas partículas reguladoras son las encargadas de reconocer a las proteínas poli-ubiquitinadas. La proteólisis es un proceso dependiente de ATP que se produce una vez hayan sido eliminados los residuos de Ub por la acción de enzimas de-ubiquitinadas

situadas en las tapas del proteasoma, (figura 1).

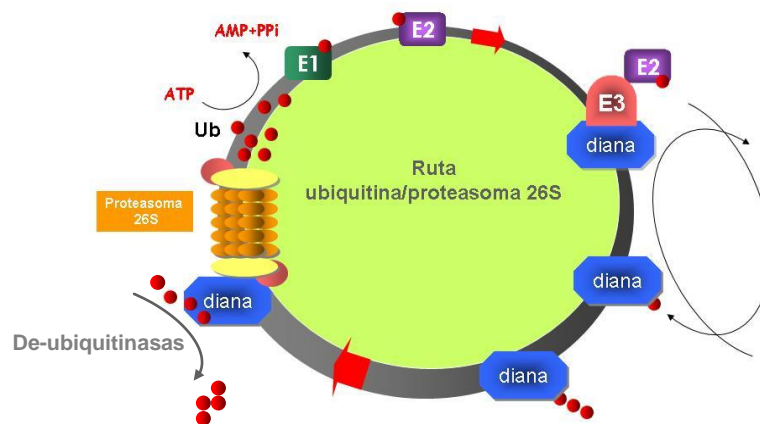


Figura 1. Ruta ubiquitina/proteasoma 26S.

Existen distintos inhibidores del sistema UPS. Por ejemplo, la Ub-aldehído que actúa bloqueando a las enzimas de-ubiquitininas de las proteínas reguladoras, o los compuestos MG132, MG115 o la epoxomicina, que bloquean a las actividades proteolíticas. En el primer caso se produce como consecuencia una acumulación de las proteínas poli-ubiquitinadas, mientras que con los otros inhibidores se produce una acumulación de las proteínas diana en general.

Gracias a la secuenciación del genoma de Arabidopsis, se han podido identificar 2 genes que codifican para enzimas del tipo E1, 45 genes que codifican para enzimas E2 y unos 1300 genes codificantes para enzimas E3. Como se comentó anteriormente, son las enzimas E3 las que reconocen específicamente a las proteínas diana, dando así especificidad al sistema. Estas E3 se dividen en dos grandes grupos según sea su dominio de unión a la proteína diana: RING/Ubox y HECT:

- RING (*Really Interesting New Gene*): La enzima E2 y la proteína a degradar quedan anclados en proximidad para que la E2 ceda su residuo de ubiquitina.
- HECT (*E6-Associated Carboxy-terminus*): La enzima E3 acepta el residuo de ubiquitina de la E2 y forma un nuevo enlace tioéster con la proteína diana para transferirle la ubiquitina (figura 2).

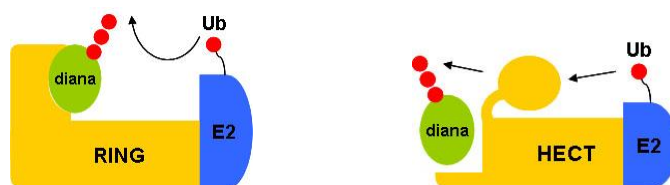


Figura 2. Clasificación de las enzimas E3 ubiquitina ligasas según su dominio de unión.

Uno de los tipos de enzimas RING más estudiados es el **complejo SCF** (*Skp1/Cullin/F-box*), que consta de 4 subunidades: CDC53 (CUL1), RBX, SKP1 (ASK1 en plantas) y proteínas con un motivo-F (figura 3). En este complejo SCF, la proteína CUL1 forma un eje central en el que se acoplan las restantes subunidades (Wiberlauer *et al.*, 2000). Se han descrito dos dominios dentro de la estructura de CUL1: Motivos A y B, directamente implicados en la interacción con las proteínas *F-box* y con las proteínas RBX, una proteína con dominio RING, cuya función es facilitar la transferencia de Ub desde las enzimas E2 hacia las proteínas diana (Zheng *et al.*, 2002). CUL1 también interacciona con la proteína SKP1/ASK1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), que a su vez establece una conexión directa con el motivo *F-box*. Estas proteínas *F-box* son las unidades intercambiables en estos complejos, son las encargadas de reclutar las proteínas diana a través de su región Carboxílica (C-t). En la mayoría de los casos, la región C-t es rica en repeticiones de leucina (Fb1) o en repeticiones de tipo WD40 (Fbw) (Skowyra *et al.*, 1997, del Pozo y Estelle, 2000). En plantas, se han descrito 2 subunidades para RBX, 5 para CUL y 21 para ASK (Farras *et al.*, 2001). Recientemente se han descrito nuevos dominios, específicos de plantas, que posiblemente estén implicados en el reconocimiento de diversos tipos de proteínas diana (Gagne *et al.*, 2002).

Gracias a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y a su posterior análisis bioinformático, se ha encontrado que aproximadamente un 5% de su proteoma pertenece a este sistema de degradación ubiquitina/proteasoma 26S. En *Arabidopsis* existen mas de 700 proteínas *F-box* distintas, un número muy superior que el encontrado en otros organismos eucarióticos (14 en *Saccharomyces crevisiae* y 74 en humanos) lo que sugiere que este sistema de regulación por proteólisis específica juega un papel muy importante en la señalización de plantas (Risseeuw *et al.*, 2003).

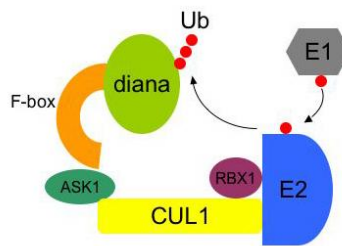


Figura 3. Subunidades que componen los complejo SCF en plantas.

1.2 LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA: LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL EN PLANTAS

En plantas, la ruta de la ubiquitina está implicada en muchos y diversos procesos biológicos tales como la respuesta a la luz (Wang y Deng, 2003), la regulación del ciclo circadiano (Nelson *et al.*, 2000, Más *et al.*, 2003), la respuesta a patógenos (Devoto *et al.*, 2003), la tolerancia al frío (Dong *et al.*, 2006) o la división celular (del Pozo *et al.* 2002, del Pozo *et al.*, 2006, Jurado *et al.*, 2008). Además el sistema UPS es un mecanismo central del control de la señalización hormonal en plantas. En algunos casos, esta ruta es el punto de interacción entre dos o más rutas necesarias para producir la respuesta apropiada a un estímulo determinado (Hellmann y Estelle, 2002).

1. 2.1 La auxina

La auxina, ácido indol- 3-acético (IAA), es una hormona vegetal que regula el crecimiento y el desarrollo, interviniendo en numerosos procesos. Esta hormona induce la organogénesis e influye sobre la arquitectura de la planta, en la generación y el mantenimiento de los primeros meristemos axilares, así como en la división inicial del cigoto (Weijers y Jurgens, 2005). Durante la embriogénesis interviene en la formación de las células en meristemos radiculares, conectividad vascular y, en general, en el desarrollo de todos los órganos. En las plantas maduras, la auxina activa la proliferación celular necesaria para promover el desarrollo del tejido vascular y la generación de órganos laterales, así como en la regulación de la polaridad de los órganos. También está implicada en el desarrollo foliar, el floral, en la asimetría, en la dominancia apical, en la expansión de la pared celular y en el desarrollo del sistema radicular (Pekker *et al.*, 2005).

En la naturaleza existen diferentes tipos de auxinas. No sólo la forma IAA es activa, ya que se ha podido comprobar que otros compuestos con un anillo indólico son también funcionales. Algunas de ellas son formas naturales como el ácido-4-cloroindol-3-acético o el ácido fenoxiacético (AFA) y otras muchas son formas sintéticas desarrolladas con fines comerciales que también presentan actividad auxínica como el ácido 2-benzofuranacético, el ácido naftalenacético (α NAA), el ácido 3-indolpirúvico, el ácido indolbutírico (IBA) o el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Las auxinas se caracterizan por poseer un transporte polar. Estas hormonas son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta: Basipétalo, en sentido descendente desde la parte aérea hacia el meristemo radicular, y acropétalo en sentido inverso, por transportadores PIN (*Pin-formed*). El transporte basipétalo se relaciona con respuestas al crecimiento como el gravitropismo, mientras que el acropétalo está involucrado en el desarrollo de las raíces laterales (Muller *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1998). La hormona también se transporta en forma aniónica (IAA^-), por transporte activo de H^+ a través de permeasas (ej: transportadores AUX1), o por simple difusión. En el floema se da un transporte no polar, con mayor velocidad, pasivo y sin gasto de energía. Este tipo de transporte se relaciona con la división del *cambium* y el desarrollo de las raíces laterales (Reed *et al.*, 1998).

La respuesta a las auxinas que se desencadena en las plantas es muy rápida (incluso minutos) (Goda *et al.*, 2004). Esta rápida activación transcripcional se debe al mecanismo de acción que integran los genes de la familia *Aux/IAA* y los factores de respuesta a auxinas (ARFs). Las auxinas regulan la expresión de genes diana mediante la degradación de los represores transcripcionales *Aux/IAA*. Estos *Aux/IAA* son una familia de proteínas nucleares de vida media de la que se han descrito 29 miembros. Los factores transcripcionales ARFs constan de 23 miembros, que se unen a elementos de respuesta a auxina (AuxREs) en los promotores de genes de respuesta a auxina activando o reprimiendo la transcripción (Ulmasov *et al.*, 1997a; Ulmasov *et al.*, 1997b; Guilfoyle *et al.*, 1998; Ulmasov *et al.*, 1999a; Ulmasov *et al.*, 1999b; Tiwari *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2007). Estos factores transcripcionales ARFs pueden funcionar como activadores o represores de la transcripción génica según sea su dominio de unión al ADN. Hasta el momento, 5 ARFs se han descrito como activadores, 15 como represores y los otros 3 restantes aún no se han podido catalogar.

(Okushima *et al.*, 2005). En la estructura de la mayoría de proteínas Aux/IAA se pueden identificar 4 dominios (I-IV). Se ha descrito mediante análisis de secuencia como por ensayos de doble-híbrido, que tanto en los factores Aux/IAA como en ARFs, los dominios III y IV están altamente conservados. Estos dominios son responsables de la formación de los homodímeros ARF-ARF o Aux/IAA-Aux/IAA, y de los heterodímeros ARF-Aux/IAA. La formación del heterodímero es más estable y puede incluso llegar a deshacer la formada por homodímeros (Ulmasov *et al.*, 1999). El dominio I puede inactivar la función de los ARFs reprimiendo la transcripción de respuesta a auxina (Tiwari *et al.*, 2004). El dominio II es importante para controlar la estabilidad de la proteína y su interacción con el complejo SCF^{TIR1/AFB1/2/3} (Colon Carmona *et al.*, 2000; Worley *et al.*, 2000; Ouellet *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2005b). Mutaciones en el dominio II bloquean la interacción entre proteínas Aux/IAA y el complejo SCF^{TIR1/AFB} incrementándose la estabilidad de las proteínas Aux/IAA, y por lo tanto la permanente represión de genes regulados por auxina (Tiwari *et al.*, 2004).

Las auxinas promueven la ubiquitinación de estas proteínas Aux/IAA por los complejos SCF^{TIR1/AFB} (*Skp1/ Cullin/ F-box*), lo que conduce a su degradación por el proteasoma 26S (Maraschin *et al.*, 2009). Así, las auxinas eliminan el efecto represor de los complejos Aux/IAA sobre los factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF, y se permite la transcripción de genes diana de las auxinas (figura 4).

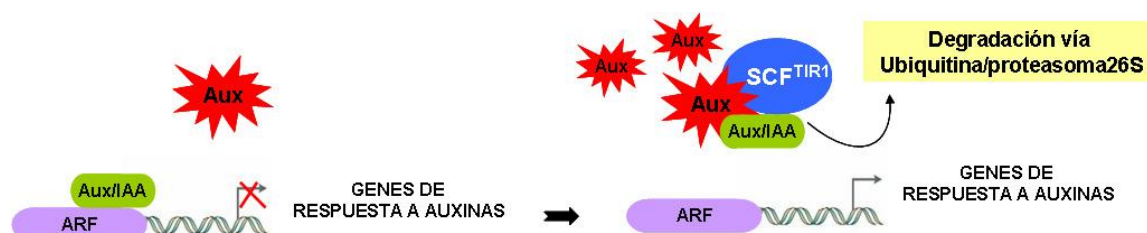


Figura 4. Mecanismo de actuación de ARF y Aux/IAA en presencia y ausencia de auxinas en el medio.

TIR1 presenta un dominio *F-box* altamente conservado y 18 repeticiones ricas en leucinas (LRRs) capaz de unirse a un sustrato en ausencia de auxinas, pero con muy baja eficiencia. Para que la unión sea efectiva es necesaria la presencia de la hormona auxina en el medio. La auxina se une a una cavidad con baja hidrofobicidad, actuando como “pegamento molecular” entre TIR1 y las Aux/IAA. Estudios en animales y plantas de otros complejos SCF muestran la necesidad de una modificación

postraducciona, por ejemplo una fosforilación, para que el sustrato pueda ser reconocido. En este caso la auxina no produce ningún cambio conformacional en el receptor o en la proteína diana, por lo que se descarta que funcione como un regulador alostérico (Tan *et al.*, 2007), pero actúa incrementando la afinidad entre ellos. El mecanismo por el que las auxinas promueven la interacción SCF^{TIR1} – Aux/IAA es la unión directa de IAA a TIR1, por lo que TIR1 se considera como un receptor de auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005b; Kepinski y Leyser, 2005; Tan *et al.* 2007). Sí se ha descrito en la bibliografía, que la presencia de la molécula de inositol hexafosfato es crítica para estabilizar el sitio de unión a auxinas en TIR1. Esta molécula está presente en todas las células eucariotas, pero hasta la fecha se desconoce si ejerce una función reguladora o estructural (Tan *et al.*, 2007). Las auxinas sintéticas como el 2,4-D y el α NAA también pueden unirse a la cavidad de TIR1, aunque con menor afinidad. El 2,4-D, a pesar de poseer un anillo más pequeño que el IAA, no encaja bien en la cavidad por su mayor hidrofobicidad, lo que dificulta su unión a TIR1. El α NAA posee un anillo aromático más grande que el IAA, sin embargo su unión a TIR1 se realiza con más efectividad que 2,4-D. Por ello se especula con la posibilidad de que la densidad de electrones del anillo sea un factor crítico para la actividad de las auxinas (Ferro *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis thaliana* existe otras 5 proteínas conocidas como AFB (*Auxin-F-box-protein*) que tienen un 50-70% de homología con TIR1 y que también están implicadas en la señalización de auxinas. Sin embargo, los mutantes individuales *afb* no presentan defectos importantes ni en el desarrollo ni en la respuesta a las auxinas. Sólo los mutantes combinados con *tir1* tienen afectada drásticamente la respuesta auxina. Así los mutantes *tir1afb2afb3*, y especialmente *tir1afb1afb2afb3*, dan lugar a diversas alteraciones en el desarrollo, generándose plantas con porte reducido y numerosos defectos asociados a la baja respuesta a auxinas, así como parada del crecimiento (Dharmasiri *et al.* 2005b).

Estudios previos sobre el transporte polar de auxinas ya habían mostrado la unión de la auxina a una proteína de membrana, ABP1 (*Auxin-binding-protein1*), que poseen un sitio de reconocimiento para la auxina. Los mutantes de pérdida de función *abp1* muestran defectos en la división celular y parada del crecimiento embrionario en el estado globular (Napier, 2004). Hasta el momento no se ha podido relacionar claramente la función de ABP1 con la de TIR1 o AFB. Probablemente ABP1 esté implicado en procesos de percepción celular de la auxina todavía desconocidos (David *et al.*, 2007).

Los estudios realizados con mutantes con una respuesta a auxina alterada han permitido establecer una ruta de señalización (tabla1). El primer mutante caracterizado fue *axr1* (Leyser *et al.*, 1993). El gen *AXR1* (*Auxin Resistant1*) codifica para una subunidad de la enzima RUB en plantas (del Pozo *et al.*, 1998). El mutante presenta una importante reducción de la respuesta a las auxinas debido a la baja capacidad de modificar a la proteína CUL1 con RUB1. La modificación de CUL1 es esencial para que se produzca el perfecto ensamblaje entre la enzima E3 y E2-Ub y la correcta actividad de la enzima E3 (figura 5). Por otro lado, la unión de RUB1 impide además la unión de CUL1 a CAND1 (*Cullin-associated and neddylation-disociated1*), una proteína de 120 KDa, que obstaculiza estéricamente la interacción entre CUL-Skp1/ASK. RUB1 es finalmente eliminado por el signalosoma COP9 (CSN) generando un equilibrio dinámico funcional entre la forma modificada y la no modificada (Zheng *et al.*, 2002).

GEN	PRODUCTO	MUTANTES	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
<i>AXR1 (Auxin Resistant1)</i>	AXR1	<i>axr1</i>	Importante reducción de la respuesta a auxinas debido a la baja capacidad de modificar CUL1 con RUB1	Lincoln <i>et al.</i> , 1990; Leyser <i>et al.</i> , 1993; Dharmasiri <i>et al.</i> , 2007.
<i>AXR5 (Auxin Resistant7)</i>	IAA1	<i>axr5-1</i> . Reducción de la respuesta a auxina	La mutación en el degrón impide la interacción con TIR1. Presenta fenotipo por la acumulación de la proteína. Agravitropismo.	Abel <i>et al.</i> 1995; Park <i>et al.</i> 2002; Yang <i>et al.</i> 2004; Zenser <i>et al.</i> 2001, 2003.
<i>SHY2/IAA3 (Supressor of HY2 or ShortHYPOCOTYL2)</i>	IAA3	<i>shy2-1; shy2-2 shy2 -3; shy2-6</i> Reducción de la respuesta a auxina	Cotiledones grandes, hipocotilo corto, alteración de numerosos genes de respuesta a auxina	Abel <i>et al.</i> 1995; Kim <i>et al.</i> 1996; Reed 2001; Reed <i>et al.</i> 1998; Soh <i>et al.</i> 1999; Tian y Reed 1999, 2003.
<i>SHY1/IAA6 (Supressor of HY1)</i>	IAA6	<i>shy1-1</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	Abel <i>et al.</i> 1994; Kim <i>et al.</i> 1996; Ramos <i>et al.</i> 2001; Reed 2001.
<i>AXR2/IAA7 (Auxin Resistant7)</i>	IAA7	<i>axr2-1</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	Abel <i>et al.</i> 1995; N. Dharmasiri <i>et al.</i> 2003; Gray <i>et al.</i> 2001; Nagpal <i>et al.</i> 2000; Timppte <i>et al.</i> 1994.
<i>BDL/IAA12 (Bodenlos/IAA12)</i>	IAA12	<i>bdl</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	Abel <i>et al.</i> 1995; Hamann <i>et al.</i> 1999; 2002; Liscum y Reed 2002.
<i>SLR/ IAA14 (Solitary Root)</i>	IAA14	<i>slr-1</i> Reducción de la respuesta a auxina	Ausencia de raíces laterales	Abel <i>et al.</i> 1995; Fukaki <i>et al.</i> 2002; 2005; Vanneste <i>et al.</i> 2005.
<i>AXR3/IAA17 (Auxin Resistant3)</i>	IAA17	<i>axr3</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	N. Dharmasiri <i>et al.</i> 2003; Gray <i>et al.</i> 2001; Leyser <i>et al.</i> 1996; Ouellet <i>et al.</i> 2001; Overvoorde <i>et al.</i> 2005; Rouse <i>et al.</i> 1998
<i>IAA18</i>	IAA18	<i>iaa18-1</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	Reed, 2001.
<i>MSG2/IAA19 (massugu2)</i>	IAA19	<i>msg2-1; msg2-2 msg2-3; msg2-4</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas. Alteraciones en hipocotilo, hojas y raíces laterales.	Liscum y Reed 2002; Tatematsu <i>et al.</i> 2004.
<i>PAP1/IAA26 (Phytochrome interacting protein1)</i>	IAA26	Reducción de la respuesta a auxina		Liscum y Reed 2002.
<i>PAP2/IAA27 (Phytochrome interacting protein2)</i>	IAA27	Reducción de la respuesta a auxina		Liscum y Reed 2002.
<i>IAA28</i>	IAA28	<i>iaa28-1</i> Reducción de la respuesta a auxina	Capacidad reducida de múltiples respuestas a auxinas	Dreher <i>et al.</i> 2006; Rogg <i>et al.</i> 2001.

Tabla 1. Algunos de los mutantes principales que presentan una alteración en la respuesta a auxinas. Modificado de Mockaitis y Estelle, 2008.

El mutante *axr1* también tiene alterada la respuesta a jasmónico. Probablemente, por estar AXR1 implicada en la activación de la CUL1 del complejo SCF^{TIR1} de señalización de esta hormona (Tiryaki y Staswick, 2002).

Las mutaciones en el dominio II de las proteínas Aux/IAA han dado lugar a numerosos mutantes que confieren una respuesta alterada a las auxinas (*iaa1/axr5*, *iaa3/shy2*, *iaa6/shy1*, *iaa7/axr2*, *iaa12/bdl*, *iaa14/slr*, *iaa17/axr3*, *iaa18*, *iaa19/msg2* y *iaa28*) (Rouse *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 1999; Nagpal *et al.*, 2000; Reed, 2001; Rogg *et al.*, 2001; Fukaki *et al.*, 2002; Hamann *et al.*, 2002; Tatematsu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004) (figura 6). La mayoría de estos mutantes tienen fenotipos pleiotrópicos que afectan al crecimiento y a múltiples procesos de desarrollo relacionados con la respuesta a las auxinas, incluyendo defectos en la formación de raíces laterales, en la embriogénesis, en el desarrollo vascular, en la respuesta trópica, una sensibilidad reducida o incrementada a auxina y la alteración de la expresión génica de genes regulados por esta hormona (Reed, 2001; Liscum *et al.*, 2002).

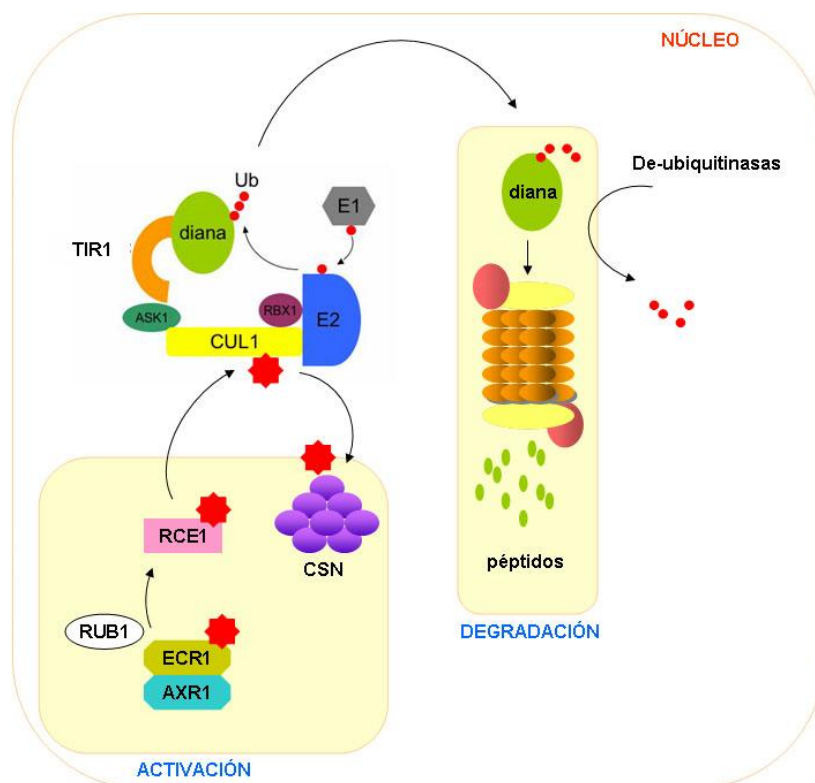


Figura 5. Activación por RUB1 de la CUL1 del complejo SCF^{TIR1} y degradación ubiquitina /proteasoma 26S mediada por auxinas.

Recientemente se han descrito importantes similitudes entre TIR1 y la proteína Fbox COI1 (*Coronative Insensitive1*), implicada en la respuesta al ácido jasmónico. Ambas proteínas promueven la degradación de represores transcripcionales en respuesta a una hormona, y muestran una estructura de dominios a nivel proteico muy similar.

1. 2.2 El ácido jasmónico

El ácido jasmónico es una hormona involucrada en la regulación del desarrollo de la planta y en la respuesta de defensa a patógenos. Está implicada en el crecimiento de la raíz, la maduración de frutos, la senescencia, la viabilidad del polen y la progresión del ciclo celular (Devoto *et al.*, 2003).

En parte, la ruta de señalización del ácido jasmónico está regulada por la vía del sistema UPS a través el complejo SCF^{COI1}. Se han descrito numerosos mutantes implicados en respuesta al ácido jasmónico, pero *coi1* es el que presenta las alteraciones más drásticas en su fenotipo debido a su alta insensibilidad a esta hormona. (Xu *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003).

La respuesta al ácido jasmónico está regulada por la familia de represores transcripcionales JAZ (*Jasmonate Zim-domain*) que se caracterizan por poseer dos dominios altamente conservados: el dominio ZIM en el extremo amino terminal (37 aa) y el dominio JAS en el extremo carboxilo (26 aa). Ambos dominios son necesarios para la unión a los factores transcripcionales y a COI1. La familia JAZ está integrada por 12 miembros y su mecanismo de actuación es similar al de los factores Aux/IAA:

- a) En ausencia de ácido jasmónico, las proteínas JAZ se unen a los factores transcripcionales MYC2 y ERF1 (*Ethylene Response factor*), reprimiendo su actividad transcripcional.
- b) En presencia de ácido jasmónico, las proteínas JAZ son degradadas y los factores de transcripción liberados. Así pueden unirse a los promotores de sus genes diana y activar su transcripción, lo que desencadena la respuesta a esta fitohormona (Lorenzo *et al.*, 2003).

ERF1 es también un elemento clave en la respuesta a etileno en Arabidopsis, y se ha demostrado que juega un papel importante en la integración de ambas señales, etileno y jasmónico, para la activación de mecanismos de defensa. La expresión de *ERF1* se induce tras la infección por patógenos necrotrofos y regula *in vivo* la expresión de genes de defensa, inhibiendo la de respuesta a herida. Su inducción requiere la activación de las señales de jasmónico y etileno simultáneamente (Lorenzo *et al.*, 2003).

Por otro lado, MYC2 es un regulador positivo de la expresión de un gran número de genes de respuesta a herida, y al mismo tiempo, reprime la expresión de genes de respuesta a patógenos. El balance entre ambos reguladores transcripcionales es clave para que se desencadene el tipo de respuesta adecuada (Lorenzo *et al.*, 2004).

1. 2.3 El etileno

El etileno es una fitohormona implicada en la respuesta a estreses bióticos y abióticos. Sin embargo, también se le ha relacionado con el crecimiento y desarrollo de las plantas, con la germinación de las semillas, el desarrollo de raíces laterales, la maduración de los frutos y la senescencia (Bleecker, 1991).

La señalización de esta hormona implica la participación de los receptores de etileno. En *Arabidopsis thaliana* se han descrito 5 receptores: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4. Los estudios de diferentes mutantes han determinado que ETR1 (*Ethylene Response1*) es el receptor principal. Este receptor está formado por un dímero de 2 proteínas integrales de membrana, con actividad histidina kinasa que tiene capacidad de autofosforilarse. La unión del etileno a su receptor induce su autofosforilación a nivel de residuos de histidina y la posterior transferencia de estos fosfatos a residuos de aspartato, lo que da lugar a la inactivación del regulador negativo CTR1 (*Constitutive Triple Response1*) que libera la función de la proteína transmembrana EIN2 (*Ethylene Insensitive2*). La proteína EIN2 funciona como un canal de iones (probablemente Ca^{+2}). Así un incremento en la concentración de Ca^{+2} activaría el factor de transcripción EIN3 (*Ethylene Insensitive3*), induciendo la transcripción de las proteínas efectoras. En ausencia de etileno los niveles constitutivos de EIN3 son bajos y están regulados vía ubiquitina/proteasoma 26S por las proteínas Fbox EBF1 (*EIN3-binding Fbox1*) y EBF2 (*EIN3-binding Fbox2*) (Binder *et al.*, 2007).

La respuesta al etileno está interconectada con la de las auxinas y las giberelinas a partir de las proteínas DELLA. Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos del crecimiento y las giberelinas promueven el crecimiento causando la destrucción de estas proteínas DELLA. La reducción o parada del crecimiento bajo condiciones de estrés y la reanudación bajo condiciones óptimas se ha asociado con el efecto de la fluctuación del balance hormonal entre ABA (ácido abscísico), giberelinas y auxinas, influyendo este balance sobre la estabilidad de las proteínas DELLA (Bennett *et al.*, 2005). La integración de estas señales regula diversos procesos de crecimiento.

Así, por ejemplo, la interacción de las auxinas y el etileno es esencial para la formación de raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2009). Por otro lado, la respuesta a las auxinas y las giberelinas son necesarias para la acción del etileno en la elongación del tallo, ya que conducen a un aumento de la actividad de la ACC (*ácido 1-aminoacilciclopropano-1-carboxílico sintetasa*), acumulándose más etileno en el tallo (Pearce *et al.*, 1991).

1.2.4. Las giberelinas

Las giberelinas pertenecen a una familia de ácidos diterpénicos, formados por cuatro unidades isoprenoides (Bramley, 1997). En la actualidad hay descritas 125 tipos diferentes de estas hormonas. Estas hormonas están implicadas en la división y en la elongación celular, acortan la interfase del ciclo celular e inducen la entrada en fase G1 de las células. Por otro lado, las giberelinas inducen la germinación, la elongación del tallo, la elongación de la raíz y la floración (Fleet y Sun, 2005).

La respuesta a las giberelinas está regulada, en parte, por la acción del represor GAI (*Gibberellin Insensitive*), una proteína de la familia DELLA, de las que se han descrito 5 miembros en Arabidopsis. Como en el caso de etileno y CTR, las giberelinas inducen la eliminación de la represión de la respuesta ejercida por parte de GAI. El mutante *gai-1*, que carece del dominio conservado en el extremo amino terminal y no puede ser degradado en respuesta a las giberelinas. Este mutante *gai-1* manifiesta una baja respuesta a giberelinas, lo que conlleva alteraciones en el desarrollo y se traduce en un fenotipo enano de la planta (Peng *et al.*, 1997).

En presencia de giberelinas, se promueve la degradación de las proteínas DELLA a través del sistema UPS. La enzima E3 encargada de su degradación es un complejo de tipo SCF compuesto por la proteína Fbox SLY1 (*Sleepy1*). Sin embargo, en este caso la hormona no se une directamente a esta Fbox si no a GID1 (*Gibberellin-Insensitive Dwarf1*). GID1 presenta alta homología con lipasas sensibles a hormonas (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005), y en Arabidopsis se han descrito 3 genes ortólogos (*GID1a*, *GID1b* y *GID1c*) con funciones redundantes. La interacción entre las proteínas GID y las proteínas DELLA se ve favorecida por la presencia de las giberelinas (Nakajima *et al.* 2006). GID1 interacciona con las proteínas DELLA a partir del extremo amino terminal de éstas y favorece su marcaje con ubiquitina por el complejo SCF^{SLY1} (Ariizumi *et al.*, 2008).

Las rutas de giberelinas y auxinas están altamente relacionadas. Las auxinas ejercen su efecto promotor del crecimiento de la raíz en *Arabidopsis* a través de la modulación de las respuestas a giberelinas, facilitando la degradación de las proteínas DELLA (Fu y Harberd 2003). Por otro lado, las auxinas inducen la biosíntesis de giberelinas, y parte de los efectos causados por una sensibilidad alterada frente a auxinas se deben directamente a los cambios en el metabolismo de las giberelinas (Frigerio *et al.*, 2006).

1.2.5. El ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un regulador del crecimiento y del desarrollo de las plantas, especialmente cuando éstas se encuentran en situaciones ambientales desfavorables. Tiene efectos contrarios a los de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas). El ABA está implicado en procesos fisiológicos como el cierre de los estomas, abscisión de hojas y fruto, embriomorfogénesis, desarrollo de las semillas (interviene en la maduración, dormición y crecimiento), síntesis y almacenaje de proteínas y lípidos, senescencia de las hojas y defensa frente a patógenos (Creelman *et al.*, 1987; 1988; Koornneef *et al.*, 1989; Ingram y Bartels, 1996).

La expresión de los genes de respuesta al ABA está regulada por distintos tipos de factores de transcripción: ABI3 (*Abciscic acid-Insensitive3*), ABI4, familia ABI5 y bZIP (*Basic Leucine Zipper*). Estos factores transcripcionales se fosforilan en respuesta a ABA. En *Arabidopsis thaliana* ABI3 y ABI5 se han descrito como los factores de mayor relevancia en la respuesta a ABA (Finkelstein *et al.*, 2002).

Las proteínas Fbox AIP2 (*ABI3 Interacting Protein*) y KEG (*Keep on Going*), forman parte de enzimas E3 de tipo RING, responsables de regular a los factores transcripcionales de respuesta a ABA mediante ubiquitinación (Lopez-Molina y Chua, 2000; Lopez-Molina *et al.*, 2001).

Las plantas son organismos sésiles, por lo que están altamente expuestas a las condiciones ambientales y requieren respuestas rápidas para hacer frente al medio en el que se encuentran. Por ello, debemos recordar que las rutas de señalización hormonal no son independientes, sino que establecen interacciones unas con otras y están sometidas a una compleja regulación a nivel molecular. Un mismo estímulo es capaz de desencadenar en la célula varias rutas simultáneamente, siendo el balance final de estas interacciones, el que va a determinar que se produzca la respuesta adecuada para cada

momento. Así, las células son capaces de combinar las mismas rutas de diferentes formas para conseguir la respuesta correcta al estímulo determinado.

Como hemos visto, en muchos casos la degradación de proteínas a través de la ruta de la ubiquitina/proteasoma 26S es clave para comprender la regulación de estas rutas hormonales descritas, así como las interacciones entre ellas. El sistema de degradación UPS además de regular la activación/desactivación de diferentes rutas mediante la degradación de represores o activadores, también es capaz de regular la intensidad de las respuestas, ya que puede regular selectivamente los niveles de los efectores.

1.3 LA RUTA UBIQUITINA/PROTEASOMA EN OTROS ORGANISMOS

Los sistemas de degradación del tipo UPS pueden encontrarse en levaduras, plantas y animales, siendo esenciales para el mantenimiento y el desarrollo de las células eucariotas. En procariotas, se ha descrito recientemente un proceso similar a la ubiquitinación en *Mycobacterium tuberculosis* basado en el marcaje con una proteína PUP (*pupylation*). A través de una cascada enzimática (enzimas E1, E2, E3) con gasto de ATP, las proteínas diana son marcadas con una cadena poli-PUP, que sería la señal para la degradación por un complejo con algunas similitudes al proteasoma. El descubrimiento de este sistema en procariotas abre una puerta a la búsqueda de fármacos específicos en patógenos (Mukherjee *et al.*, 2008). En humanos, los sistemas de ubiquitinación están implicados principalmente en diferenciación celular, proliferación, apoptosis, transcripción génica, respuesta inmunológica y regulación metabólica. Muchas patologías van asociadas a defectos en estos procesos biológicos, principalmente, cuando se ven afectadas las enzimas E2, E3 o el proteasoma. Tal es el caso de los procesos de respuesta autoinmune, respuestas inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington) o cáncer. Su importancia en salud humana ha convertido a los sistemas UPS en una pieza clave para estudios farmacológicos. El descubrimiento de nuevas drogas está centrado en identificar inhibidores específicos de las enzimas E2, E3, enzimas de-ubiquitinadoras (DUBs) o de las actividades reguladoras o proteolíticas del proteasoma. Un buen ejemplo en animales es el del ortólogo de RUB1 conocido como Nedd8, que es el responsable de la activación de la CUL, y por tanto, de que los complejos SCF sean funcionales. Las

alteraciones en CUL se asocian con la enfermedad de Alzheimer, ya que el proceso de unión de la ubiquitina a las proteínas específicas en la sinapsis neuronal es crítico para mantener la plasticidad sináptica. La correcta actividad de los complejos SCF es clave para controlar la flexibilidad de los niveles de proteínas que se necesitan en cada momento (Jones *et al.*, 2008).

1.4 CICLO CELULAR EUCARIOTA

En los organismos eucariotas existe un alto nivel de coordinación entre la división y la diferenciación celular, procesos claves para el correcto crecimiento y desarrollo de estos. La proliferación celular implica el crecimiento de la célula, la duplicación del ADN, su distribución equitativa a las células hijas y la división citoplasmática, generando dos células hijas. A éste conjunto de procesos se le denomina ciclo celular. El ciclo consta de 4 fases: **G1** (la célula crece y acumula nutrientes), **S** (se duplica el material genético), **G2** (se comprueba la fidelidad de la replicación), y **M** (reparto equitativo del material genético a las células hijas). Existen señales que inducen la entrada en división y señales que detienen el ciclo en fase G1, interrumpiendo la proliferación y haciendo que la célula entre en una fase de quiescencia (**G0**) (Muller *et al.*, 1993) donde la célula queda metabólicamente activa pero no prolifera (figura 6). Por otro lado, también existen señales que paran la célula en los llamados puntos de control (*checkpoints*) (G1 y G2), donde la célula comprueba que se dan todos los requisitos necesarios para el progreso a la siguiente fase (Hartwell y Weinert, 1989).

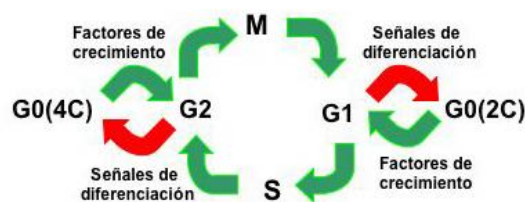


Figura 6. Fases del ciclo celular y su relación con la quiescencia G0.

La progresión a través de las distintas fases del ciclo celular está controlada, entre otros, por los complejos CDKs/ciclinas y la ruta de la proteína del retinoblastoma

RBR y los factores transcripcionales E2F/DP. Estos mecanismos están muy conservados en todos los eucariotas, tanto en levaduras, en mamíferos como en plantas (De Veylder *et al.*, 2007).

Las proteínas reguladoras ciclinas (CYC) son una familia de proteínas que se sintetizan y se destruyen en cada ciclo celular. En plantas, se han descrito unas 60 ciclinas (49 en *Arabidopsis thaliana*), más que en ningún otro organismo eucariota. Se clasifican en: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2 (Renaudin *et al.*, 1996; Barroco *et al.*, 2003). Todas ellas contienen una región común conocida como *cyclin box*, de aproximadamente 150 aminoácidos, un dominio relativamente conservado responsable de la unión y activación de las CDKs. Mutaciones en esta región inhiben tanto la unión como la activación (Enders y Maude, 2006). Las CDKs son una familia de proteínas quinasas que se unen a ciclinas específicas y son activadas por ellas. En plantas, se han clasificado en 12 tipos de A-F (Menges *et al.*, 2005; Dewitte y Murray, 2003; Inze y De Veylder, 2006). No todas las ciclinas y CDKs funcionan como reguladoras del ciclo celular, ya que también están implicadas en la regulación de la transcripción, reparación del ADN, diferenciación y apoptosis. Por ejemplo, diferentes complejos ciclina/CDK, como ciclina C/CDK8, ciclina T/CDK y ciclina H/CDK7, se sabe que son componentes de la maquinaria basal de transcripción. Por otro lado, la ciclina K forma un complejo con la ARN polimerasa II a través de la activación de CDK9 (Shore *et al.*, 2003).

La actividad CDK es necesaria tanto para la transición G1/S como para la progresión de S y el tránsito G2/M. La actividad CDK se controla por diferentes mecanismos como son las fosforilaciones, de-fosforilaciones y por los inhibidores de CDKs (CKIs), que se unen a las ciclinas impidiendo así la activación de los CDKs. En mamíferos, los CKIs han sido clasificados en dos familias distintas atendiendo a su estructura y dianas (Pavletich, 1999): INK4 y CIP/KIP. La familia INK4 consta de 4 miembros (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}) inhibidores de CDK4-6. La familia CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}) inhibe un amplio espectro de complejos CDK/ciclina (Nakayama y Nakayama, 1998). En humanos, p27^{KIP1} regula la correcta progresión del ciclo celular e integra las señales necesarias para el desarrollo (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001) y su regulación corre a cargo de la proteólisis por ubiquitinación a través del complejo SCF^{SKP2} en el núcleo, y por otra proteína E3

ubiquitina ligasa con dominio RING KPC (*Kip1 ubiquitination-Promoting Complex*) en el citoplasma (Verma *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997; Tomoda *et al.*, 1999; Hengst, 2004; Kamura *et al.*, 2004). Probablemente, los inhibidores CIP/KIP juegan un doble papel porque también participan en el ensamblaje y estabilización de los complejos CDK4-6/ciclinaD (LaBaer *et al.*, 1997).

En plantas, se han descrito inhibidores similares a CIP/KIP en *Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium rubrum*, *Pisum sativum*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa* y *Nicotiana tabacum* (Jasinski, 2002). Por homología de secuencia con p27^{KIP1} de mamíferos, se han descrito en *Arabidopsis thaliana* 7 inhibidores de CDK conocidos como ICKs (*Interactors of Cdc2 Kinase*) o KRPs (*Kip-related proteins*). Todos poseen un dominio de unión o inhibición de CDKs en el C-t similar al de p27^{KIP1} de humanos (Wang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003). Hasta el momento, los 7 KRPs identificados interaccionan con ciclinas del tipo D y algunos con CDKs del tipo A. ICK1/KRP1 y ICK2/KRP2 inhiben *in vitro* la actividad quinasa de los complejos CDK/ciclina, y se regulan vía proteasoma (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2009). La sobreexpresión en *Arabidopsis* de ICK1/KRP1, ICK2/KRP2 y ICK4/KRP6, da lugar a un fenotipo similar a base de hojas serradas, flores modificadas, un menor número de raíces laterales, y una reducción del crecimiento general de la planta (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Jasinski *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003). ICK4/KRP6 también se regula a través del sistema UPS, por la acción de dos proteínas de tipo RING-H2 grupo F 1a y 2a (RHF1a y RHF2a) con funciones redundantes en la gametogénesis en *Arabidopsis*. RHF1a/2a median la degradación de ICK4/KRP6 cuya acumulación durante la meiosis es crítica para la posterior progresión del ciclo celular mitótico durante el desarrollo de los gametofitos. Los dobles mutantes *rhf1a/rhf2a* son defectivos en la formación de gametofitos femeninos y masculinos. (Liu *et al.*, 2008).

Recientemente se ha descrito otra proteína con motivo-F, FBL17, que forma un complejo SCF (SCF^{FBL17}) y que recluta a ICK4/KRP6 e ICK5/KRP7 para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma. Mutantes *fbl17* acumulan ICK4/KRP6 y tienen inhibido la progresión del ciclo celular en la germinación. SCF^{FBL17} parece ser esencial en la proliferación del polen y para la producción de las células madres (Kim *et al.*, 2008).

La transición G1/S es uno de los puntos de control más importante durante el ciclo celular eucariótico, ya que una vez iniciada la fase S la célula deberá concluir el resto de fases o bien dirigirse a apoptosis. Una de las dianas principales de los complejos CDKs/ciclinas para iniciar el paso de G1 a S es la proteína retinoblastoma (RBR). Durante G1 la proteína RBR inhibe la actividad de los factores transcripcionales E2F, que regulan la expresión de genes de la fase S, entre otros. Gracias a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* se han podido identificar muchos de los reguladores de ciclo celular descritos en levaduras y en humanos. Sin embargo hasta la fecha, la función biológica de muchos de ellos es desconocida. En *Arabidopsis* se han identificado 6 genes *E2F* (*E2FA*, *E2FB*, *E2FC*, *E2FD*, *DEL2*, *E2FE*, *DEL1* y *E2FF*, *DEL3*), 2 genes *DP* (*DPA* y *DPB*) y un gen *RBR*. E2F y DP, son factores transcripcionales que dimerizan y pueden actuar como activadores (*E2FA/DPA*) (De Veylder *et al.* 2002) o represores de la transcripción génica (*E2FC/DPB*) (del Pozo *et al.* 2002; del Pozo *et al.*, 2006). La proteína RBR interacciona con las proteínas E2F produciendo un complejo represor. En condiciones que estimulan la división celular, la proteína RBR es fosforilada por las CDKs/ciclinas, lo que provoca la disociación de los complejos RBR/E2F, quedando los complejos E2F/DP activadores libres para activar la expresión génica (Bonnioti *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, al menos 70 de los 181 genes que fueron identificados como posibles dianas de E2FA, están involucrados en el ciclo celular, la replicación del ADN y la dinámica de la cromatina (Boudolf *et al.*, 2004).

El ciclo celular también está bajo el control de una serie de señales externas (hormonas, azúcares e inhibidores) que determinan cuándo y dónde deben realizarse las divisiones celulares. Durante la fase G1, las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, los brasinoesteroides y la sacarosa activan la expresión de la ciclina D y de su subunidad catalítica CDKA, posibilitando la entrada en la fase S del ciclo. Por otro lado, el ácido abscísico estaría reprimiendo la actividad de la CDKA y promoviendo la acumulación de la proteína inhibidora de la quinasa. El inhibidor se une al complejo CDKA/ciclinaA impidiendo la entrada en fase S. Por último, las auxinas, las citoquininas y las giberelinas inducen la expresión de las ciclinas A y B, y activan a las CDKA y CDKB, lo que promueve la entrada en fase M. Los niveles de proteínas ciclinas, CKIs y otras proteínas reguladoras oscilan durante el ciclo celular como consecuencia de su regulación transcripcional y de su degradación. Uno de los mecanismos que controla finamente la división celular es la degradación selectiva de proteínas de este proceso, que en eucariotas se produce principalmente por la ruta UPS.

En humanos, se ha descrito un complejo SCF integrado por una proteína *F-box* SKP2 (SCF^{SKP2}) que controla la estabilidad, y por tanto la actividad, de numerosos reguladores del ciclo celular como p27 (Tsvetkov *et al.*, 1999), ciclina E (Nakayama *et al.*, 2001), E2F1 (Marti *et al.*, 1999), CDK9 (Kierman *et al.*, 2001), RB-like p130 (Tedesco *et al.*, 2002), p57kip2 (Kamura *et al.*, 2003) y CDT1 (Li *et al.*, 2003). El hecho de que intervenga en el control de tantos reguladores de ciclo celular y de que se haya relacionado con procesos tumorales, ha llevado a pensar que *SKP2* juega un papel clave en el control de la proliferación celular (Krek, 1998; Dehan y Pagano, 2005). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado dos genes, ***SKP2A*** y ***SKP2B***, que codifican proteínas con alta homología a SKP2 de humanos. Ambas proteínas presentan entre ellas aproximadamente un 80% de homología de secuencia, pero sin embargo, sus funciones parecen ser muy distintas. SKP2A regula la degradación del represor de ciclo celular E2FC/DPB (del Pozo *et al.*, 2002, del Pozo *et al.*, 2006). Estudios recientes muestran que SKP2A recluta a DPB, para su degradación, mientras que el mutante *skp2a* acumula altos niveles de ambos factores transcripcionales E2FC y DPB (del Pozo *et al.*, 2006). En el caso de E2FC, esta proteína debe estar fosforilada por para ser reconocida por SKP2A. Esta fosforilación se produce gracias a los complejos CDKA;1/CYC2;2 o CDKA;1/ CYCD2;1 (del Pozo *et al.*, 2002). Para DPB se desconoce por el momento el requerimiento de la fosforilación, pero sí se ha descrito que DPB se fosforila, y que esta forma fosforilada es más estable (del Pozo *et al.*, 2006).

En plantas, SKP2B está implicado, junto con otra proteína de tipo RING (RKP), en la degradación del inhibidor de CDKs ICK1/KRP1, a través de la ruta ubiquitina/proteasoma 26S. ICK1/KRP1 interacciona con el complejo CDKA;1/ CYCD2;1 implicado en la transición G1/S del ciclo celular. Estos resultados han sugerido que ambas proteínas, SKP2B y RKP, tiene un papel relevante en la regulación del ciclo celular (Ren *et al.*, 2008).

1.5 EL SISTEMA RADICULAR. DESARROLLO DE RAÍCES LATERALES

El éxito de las plantas depende en gran medida de su capacidad de adaptación a los diferentes ambientes a los que está sometida. El correcto desarrollo del sistema radicular es crucial en estos organismos. La disponibilidad de agua y nutrientes, tales como el nitrato (Leyser, 1998; Zhang y Forde, 2000), el fosfato (Lopez-Bucio *et al.*, 2002) o el sulfato (Kutz *et al.*, 2003; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004), son los factores limitantes para el crecimiento en todos los ecosistemas, y su adquisición determina la capacidad de las plantas para poder mantener la proliferación celular, el crecimiento y en última instancia la eficiencia reproductiva (Lopez-Bucio *et al.*, 2003).

La capacidad de crecimiento de una planta reside en la tasa de división celular de las células de los meristemos apicales y radicales y su posterior diferenciación. En estos meristemos se localiza un grupo de células madres que son capaces de dividirse constantemente a lo largo de toda la vida de la planta (*stem cells*), y generar todas las líneas celulares necesarias para el desarrollo de los diferentes tejidos u órganos. Debido a la constante adaptación de las plantas al medio, la división celular en estos meristemos está sujeta a continuos cambios que modulan su tasa de proliferación y posterior diferenciación.

La formación de raíces laterales es un proceso organogénico de gran importancia que contribuye al establecimiento de la arquitectura de la raíz en plantas superiores (Fukaki *et al.*, 2009). La raíz es el órgano que permite la absorción de agua y nutrientes, da soporte estructural, y ancla la planta al sustrato. Además participa en las interacciones con el ambiente biótico del suelo. La morfología de la raíz está determinada genéticamente y puede variar de una especie a otra. Sin embargo, el desarrollo y arquitectura final del sistema radicular está fuertemente influenciada por el ambiente. El carácter sésil de las plantas se traduce en una alta plasticidad en los fenotipos del sistema radicular que se puede encontrar en la naturaleza. Las plantas son capaces de modular su sistema radicular para obtener una mayor adaptación a los medios con baja disponibilidad de nutrientes y agua, incrementando la superficie de absorción, gracias a un mayor número de raíces laterales y de pelos radicales. El patrón de desarrollo radicular está controlado por factores endógenos (dominancia apical, número y posición de raíces laterales) y exógenos (la presencia de nutrientes y agua, la gravedad o la intensidad y calidad de la luz) (Woodward *et al.*, 2005).

El desarrollo del sistema radicular depende del número y de la disposición de las raíces laterales (RL) a lo largo del eje de la raíz principal. Las RL se forman a partir de

unas pocas células del periciclo adyacentes al protoxilema denominadas células fundadoras (Casimiro *et al.*, 2001; Beeckman *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003). En regiones distales del meristemo, la mayor parte de las células del periciclo se paran en la fase G1, pero las adyacentes al protoxilema avanzan hacia la fase G2, quedándose en esta fase como células competentes para formar primordios laterales, las cuales en respuesta a un incremento de las auxinas son capaces de comenzar a dividirse de nuevo para formar un primordio de raíz lateral. Posiblemente el inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas, ICK2/KRP2 juega un papel clave en esta parada, ya que ICK2/KRP2 se expresa en altos niveles en las células no formadoras de RL (floema). Además la sobreexpresión de este gen reduce severamente la formación de RLs (Himanen *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, la mayoría de los primordios de raíces laterales (PRL) derivan de dos células del periciclo próximas al xilema (Kurup *et al.*, 2005), cuya división es inducida por la acumulación de auxinas (Laskowski *et al.*, 1995). Los inhibidores del transporte de auxinas (como los NPAs) bloquean la división de células del periciclo. Las citoquininas alteran la expresión de los genes que codifican para los transportadores de auxinas PIN impidiendo la formación del gradiente necesario para el desarrollo de los primordios (Casimiro *et al.*, 2001; Laplace *et al.*, 2007).

El inicio de las RL en *Arabidopsis thaliana* se produce por una serie de divisiones anticlinales (perpendicular al eje de la raíz) y periclinales (paralela a la dirección de la raíz) de las células del periciclo próximas al xilema (Malamy *et al.*, 1997; Beeckman *et al.*, 2001; Casimiro *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003). Las divisiones anticlinales son asimétricas, dando lugar a dos células hijas de pequeño tamaño que quedan rodeadas por las otras 2 células flanqueantes de mayor tamaño. Tras dos rondas de divisiones anticlinales, se forma un *core* central con las cuatro células pequeñas resultantes. En este momento, se produce un cambio en el plano de división de estas células iniciándose las divisiones periclinales. Las células flanqueantes y adyacentes, que no se habían dividido, comienzan su división anticlinal. La generación de los primordios se ha dividido en ocho estadios (I a VIII) en los que tras sucesivos procesos de división anticlinal, periclinal y expansión celular se genera un primordio con organización similar al meristemo de la raíz principal (Malamy *et al.*, 1997) (figura 7).

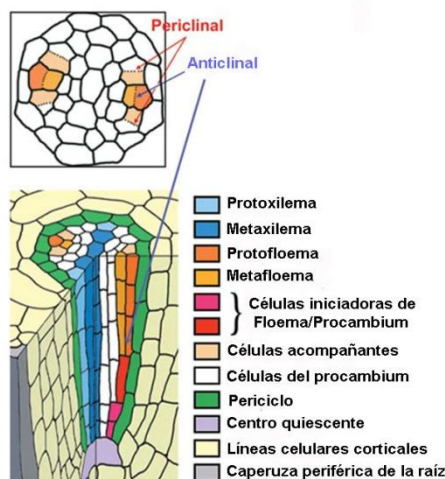


Figura 7. Esquema del desarrollo del tejido vascular en raíz *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Martin *et al.*, 2003.

Como se ha comentado anteriormente, las auxinas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la raíz, participando directamente en la formación de raíces laterales. Mutaciones en genes implicados en la respuesta a auxina alteran tanto el patrón como el número de raíces laterales. Los mutantes *tir1* presentan una disminución del número de raíces laterales en comparación con la planta silvestre (Ruegger *et al.*, 1998). El triple o cuádruple mutante para TIR1/AFBs (*tir1afb2afb3* y *tir1afb1afb2afb3*) tiene efectos pleiotrópicos muy acusados, dando fenotipos relacionados con la respuesta a auxina, incluyendo pérdida completa de raíces laterales. Esto indica que TIR1/AFBs actúan de forma redundante como receptores de auxina en la formación de raíces laterales además de en otros procesos de crecimiento y procesos de desarrollo (Dharmasiri *et al.*, 2005). Mutaciones a nivel de los integrantes de la ruta de conjugación de RUB/Nedd8 (AXR1, ECR1, RCE1, RUBs, SGT1b/ETA3, CAND/ETA2, y COP9) producen acumulación de proteínas Aux/IAA y una posterior alteración en la respuesta a auxina que se traduce en la disminución del número de raíces laterales (tabla 2) (Dharmasiri *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha descrito que otras hormonas también participan en la formación de las raíces laterales, como es el caso de las citoquininas (Li *et al.*, 2006) y el ABA (de Smet *et al.*, 2003), que regulan negativamente la formación de raíces laterales, o los brasinoesteroides que tienen efectos sinérgicos en las respuestas mediadas por auxinas (Bao *et al.*, 2004).

GEN	PRODUCTO	CARACTERÍSTICAS	MUTANTES	REFERENCIAS
<i>ASK1</i>	<i>Arabidopsis</i> SKP1	Ortólogo de Skp1 de levaduras; Une proteínas F-box a CUL1	<i>ask1</i> reducida respuesta a auxina	Gray et al. 1999
<i>CUL1</i>	CULLIN1/AUXIN RESISTANT 6 (AXR6/CUL1)	Proteína que sirve de <i>core</i> estructural para el resto de integrantes del complejo SCF	<i>cul1</i> reducida respuesta a auxina	Hellmann et al. 2003, Moon et al. 2007, Shen et al. 2002
<i>RBX1</i>	RING-H2 finger protein	Ortólogo BX/ROC/Hrt. Subunidad de acoplamiento para Ub-E2	<i>rbx1</i> reducida respuesta a auxinas	Gray et al. 2002
<i>RUB1y RUB2</i>	RELATED TO UBIQUITIN 1 and 2	Ortólogo de Nedd8	<i>rub1</i> y 2 reducida respuesta a auxinas <i>RUB1</i> y <i>RUB -2</i> son esenciales para el desarrollo	Bostick et al. 2004
<i>AXR1</i>	AUXIN RESISTANT1	Activación de RUB/Nedd8	<i>axr1</i> Reduce la respuesta a auxinas y la modificación de CUL1 por RUB	del Pozo & Estelle 1999, del Pozo et al. 2002, Leyser et al. 1993
<i>AXL</i>	AUXIN RESISTANT1-LIKE	Activación de RUB/Nedd8	<i>axl</i> La pérdida de función actúa de forma sinérgica con <i>axr1</i>	Dharmasiri et al. 2007
<i>ECR1</i>	RUB E1 enzyme subunit	Activador de RUB por transferencia a RCE1 junto con AXR1/AXL	<i>ecr1</i> La pérdida de función reduce múltiples respuestas a auxinas	del Pozo & Estelle 1999, del Pozo et al. 2002, Woodward et al. 2007
<i>RCE1</i>	E2 enzyme for RUB conjugation	Interacciona con RBX1 y SCF ^{TIR1}	<i>rce1</i> La pérdida de función reduce múltiples respuestas a auxinas	del Pozo & Estelle 1999, S. Dharmasiri et al. 2003
<i>CSN5</i>	Component of COP9 signalosome	Interacciona con SCF; elimina la modificación de CUL1 por RUB; regula el ensamblaje de SCF	<i>csn5</i> La pérdida de función reduce múltiples respuestas a auxinas	Dohmann et al. 2005, Peng et al. 2003, Schwechheimer et al. 2001
<i>CAND1</i>	Cullin-associated and neddylationdissociated1	Ortólogo de Cand1 de animales; Interacciona con CUL1; regula el ensamblaje de SCF	<i>cand1</i> La pérdida de función reduce múltiples respuestas a auxinas	Alonso-Peral et al. 2006, Cheng et al. 2004, Chuang et al. 2004, Feng et al. 2004
<i>SGT1b</i>	Suppressor of G2 allele of <i>skp1</i> / Enhancer of TIR1 auxin resistance ETA3	Su ortólogo en levaduras interactúa con Skp1	<i>sgt1b</i> La pérdida de función reduce múltiples respuestas a auxinas	Gray et al. 2003, Walsh et al. 2006

Tabla 2. Proteínas involucradas en el ensamblaje de los complejo SCF de *Arabidopsis thaliana* con función en el desarrollo mediado por la respuesta a auxinas. Modificado de Mockaitis y Estelle, 2008.

El mutante *slr* (Fukaki *et al.*, 2002), que carece totalmente de RLs, ha sido una buena herramienta para dilucidar los genes implicados en la formación de estas RLs mediante estudios transcriptómicos. Algunos de estos genes identificados en los análisis transcriptómicos regulan la respuesta a auxinas o el ciclo celular. Otros por el contrario, como inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (KRPs), reprimen su expresión durante el desarrollo de las RLs (Himanen *et al.*, 2002; Himanen *et al.*, 2004; Vaneste *et al.*, 2005). El gen *SLR* codifica para el represor transcripcional Aux/IAA14, que está regulando negativamente la respuesta a las auxinas. La mutación en *slr* se localiza en el dominio II de la proteína IAA14 que afecta a su estabilidad, generando un mutante dominante estable, con lo que la respuesta a las auxinas está constitutivamente reprimida (Fukaki *et al.*, 2002). La sobreexpresión de genes reguladores positivos de la división celular en el mutante *slr1* provocan la división de las células del periciclo, pero éstas se quedan paradas en estadios tempranos de primordios y no se desarrolla una RL. Por ello, se ha propuesto que *SLR*, y por tanto la respuesta a auxinas, son necesarias tanto para la inducción de la división de las células del periciclo como para la posterior emergencia de las RL (Vaneste *et al.*, 2005). La mutación *slr1* bloquea las divisiones anticlinales durante la etapa temprana de formación de raíces laterales. Por el contrario, los mutantes *axr5/iaa1*, *shy/iaa3*, *msg2/iaa19* e *iaa28-1* no bloquean completamente la formación de raíces laterales (Tian *et al.*, 1999; Rogg *et al.*, 2001; Tatematsu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004) sugiriendo que hay diferencias funcionales entre las proteínas Aux/IAA, o que no todos ellos funcionan regulando la formación de raíces laterales (Weijers *et al.*, 2005). Al contrario que *slr1*, el mutante *axr2/iaa7* produce más raíces laterales y el mutante *axr3/iaa17* más raíces adventicias (Leyser *et al.*, 1996; Nagpal *et al.*, 2000), indicando que las proteínas Aux/IAA tienen distintas funciones tanto en la respuesta a las auxinas como en la formación de raíces laterales.

La arquitectura radicular de las plantas depende también de los nutrientes disponibles en el medio (fósforo, nitrógeno, azufre, potasio, calcio, hierro, azúcares, agua, etc.). La abundancia y distribución de nutrientes en el suelo no es homogénea y con frecuencia estos elementos actúan como señales que alteran el desarrollo del sistema radicular (Clarkson, 1985; López-Bucio *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha determinado que la disponibilidad del hierro altera la producción de pelos absorbentes en diversas especies vegetales y la producción de raíces laterales en *Cassuarina glauca* y *Lupinus cosentinii* (Watt y Evans, 1999; Schmidt *et al.*, 2000). La disponibilidad del

nitrate (NO_3^-) que es la fuente principal de nitrógeno para las plantas, estimula la elongación de las raíces laterales presentes en esa zona, por lo que podría estar actuando como una señal que regula directamente la actividad de los meristemas de las raíces laterales (Zhang y Forde, 1998). Uno de los genes implicados en la ruta de señalización del nitrato es el gen *ANRI* que codifica para un factor de transcripción de la familia MADS-box (Zhang y Forde, 1998). Hay evidencias que sugieren que esta ruta está relacionada con una vía de señalización mediada por auxinas, ya que la mutante *axr4* no responde a la respuesta localizada de NO_3^- (Zhang *et al.*, 1999). También está relacionado con ABA, ya que las mutantes insensibles a ABA, *abi4-1*, *abi4-2* y *abi5* no muestran alteraciones en el desarrollo de las raíces laterales cuando crecen en medio con disponibilidad alterada de NO_3^- (Signora *et al.*, 2001). Otro de los nutrientes que limita con mayor frecuencia el rendimiento de los cultivos es el fósforo (Pi), que es un elemento esencial, cuya deficiencia modifica severamente la fisiología y el desarrollo de las plantas (Zhang y Forde, 1998). En *Arabidopsis* la deficiencia de Pi altera la iniciación y elongación de las raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2002) permitiendo a la planta incrementar la capacidad de su raíz para hacer más eficiente la absorción del Pi y de esta manera mantener su metabolismo. Se ha publicado que las alteraciones en el patrón de formación y emergencia de raíces laterales en respuesta a la disponibilidad de Pi están mediadas por cambios en la sensibilidad a auxinas en raíces de *Arabidopsis* (López-Bucio *et al.*, 2005). Estos cambios también alteran la expresión de genes de respuesta a auxinas y la sensibilidad de células del periciclo a la proliferación. Plantas crecidas en condiciones limitantes de fosfato desarrollan un incremento en la expresión del receptor de auxinas TIR1 y un aumento en la degradación de factores de respuesta a auxinas Aux/IAA. Así, puede darse la transcripción de genes de respuesta a auxinas (entre ellos los involucrados en la regulación del ciclo celular), lo que conlleva como respuesta final la proliferación celular y la formación de más raíces laterales con el fin de alcanzar una nueva fuente de Pi en el medio (Pérez-Torres *et al.*, 2008).

1.6 EL ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS.

Las plantas como organismos sésiles necesitan un sistema rápido y eficaz para poder adaptarse a nuevas condiciones ambientales desfavorables y así, modificar y ajustar el desarrollo y metabolismo en concordancia con tales cambios. A nivel agrícola, el estrés abiótico provoca una disminución media del rendimiento de los terrenos agrícolas en un 50% a nivel mundial (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, la sequía y la salinidad se están extendiendo de forma especial en ciertas regiones y podrían dar lugar a una excesiva salinidad de más del 50% de la tierra cultivable para el año 2050 (Wang *et al.*, 2003). Por otra parte, aunque se reanude la normalidad metabólica tras la desaparición del estrés, el rendimiento de los cultivos y la calidad de las reservas quedan afectados severamente. Por ello, el estudio de los mecanismos de tolerancia/resistencia a estos estreses puede favorecer el desarrollo de los cultivos.

El estrés abiótico puede ser producido por distintos factores ambientales, como son las altas/bajas temperaturas, la salinidad, la sequía o las deficiencias nutricionales, entre otros. La sequía y salinidad se manifiestan como un estrés osmótico que provoca la disrupción de la homeostasis y la distribución de iones en la célula (Serrano *et al.*, 1999; Zhu, 2002). Por otra parte, el estrés oxidativo que acompaña frecuentemente a las altas temperaturas, la salinidad o la sequía puede provocar desnaturalización de proteínas funcionales o estructurales (Smirnoff, 1998). A su vez, las bajas temperaturas conducen a una deshidratación celular y a la congelación del medio extracelular, reducen la absorción y la conducción de agua nivel de la raíz (Levitt, 1980). En la mayoría de estos casos si el estrés es de alto nivel y prolongado en el tiempo, las células entran en el programa de muerte celular. La respuesta a estos estímulos ambientales requiere un mecanismo integrado donde las señales internas y externas se detectan y ocasionan una reacción apropiada en la planta (Stepanova y Alonso, 2005). El estrés abiótico provoca una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan negativamente al crecimiento de la planta y a su productividad (Wang *et al.*, 2001). Los principales mecanismos fisiológicos de respuesta general al estrés están relacionados con respuestas plásticas como modificaciones en la época de senescencia, el cierre estomático, el mantenimiento de la estabilidad de las membranas celulares y de los orgánulos, y los cambios en la elasticidad de la pared celular (Chinnusamy *et al.*, 2004; Stepanova y Alonso, 2005). La hormona ABA está considerada como la reguladora principal de diversas respuestas a estrés en plantas. La producción de ABA se incrementa en condiciones de estrés dando lugar a numerosos

efectos fisiológicos como el cierre de los estomas, la inhibición del crecimiento del tallo y de la formación de raíces laterales, la inhibición de la germinación, el estímulo de la dormancia en las semillas y yemas o el bloqueo del desarrollo de los primordios de las raíces laterales, entre otros (Fedoroff, 2002; Mandadi *et al.*, 2009).

En el proceso de señalización siguiente a la percepción, el estímulo se amplifica y se transduce mediante la maquinaria de transducción de señales que puede ser diferente en cada caso. La regulación espacial y temporal de patrones de expresión de genes de estreses específicos es también una parte importante de la adaptación de la planta (Riechmann *et al.*, 2000). Una vez registrada y amplificada, la señal del estrés se transduce al núcleo, donde se activan genes que codifican factores de transcripción (STF) DREB, MYC, MYB, CBF y HSF, entre otros, que contienen secuencias complementarias a elementos en los promotores de los genes sensibles al estrés (SRG). La síntesis de factores de transcripción producen la activación transcripcional de los promotores de genes que contienen elementos ABRE, LTRE, DRE, HSE y ARE, sensibles al estrés (SRE), a los que se unen estos factores de transcripción. Los genes de respuesta al estrés (SRG) son los responsables últimos de la respuesta bioquímica celular y la consecuente respuesta fisiológica en la planta (Lamotte *et al.*, 2005; *et al.*, 2005). Los productos de estos genes de respuesta a estrés se pueden dividir en dos grupos. El primero engloba las proteínas que probablemente funcionan en la tolerancia directa al estrés. Se trata de proteínas de membrana que participan en el movimiento de agua a través de la membrana plasmática, de las enzimas implicadas en la biosíntesis de osmoprotectores como azúcares, prolina y glicina-betaína, de proteínas que protegen macromoléculas y membranas (proteínas LEA, osmotina, proteínas de anticongelación, chaperonas y proteínas de unión al mRNA), proteasas para el recambio proteico, y de enzimas de detoxificación (glutathione- S-transferasa, hidrolasa de epóxidos solubles, catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa) (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003). La sobreexpresión de algunos de estos genes genera fenotipos tolerantes al estrés como es el caso del factor de transcripción AP2/EREBP cuya sobreexpresión mejora la resistencia al estrés salino en tabaco (Guo *et al.*, 2004). El segundo grupo contiene aquellos factores proteicos que participan en la transducción de la señal que se produce en la respuesta al estrés. Se trata de proteínas quinasas, factores de transcripción, fosfolipasa C, y proteínas 14-3-3, entre otros (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2003).

Una vez superadas las condiciones adversas, la reanudación del crecimiento se ha asociado con la fluctuación del balance hormonal entre ABA, giberelinas y auxinas (Bennet *et al.*, 2005). Para poder reestablecer el crecimiento, los meristemas deben permanecer viables para poder continuar proliferando.

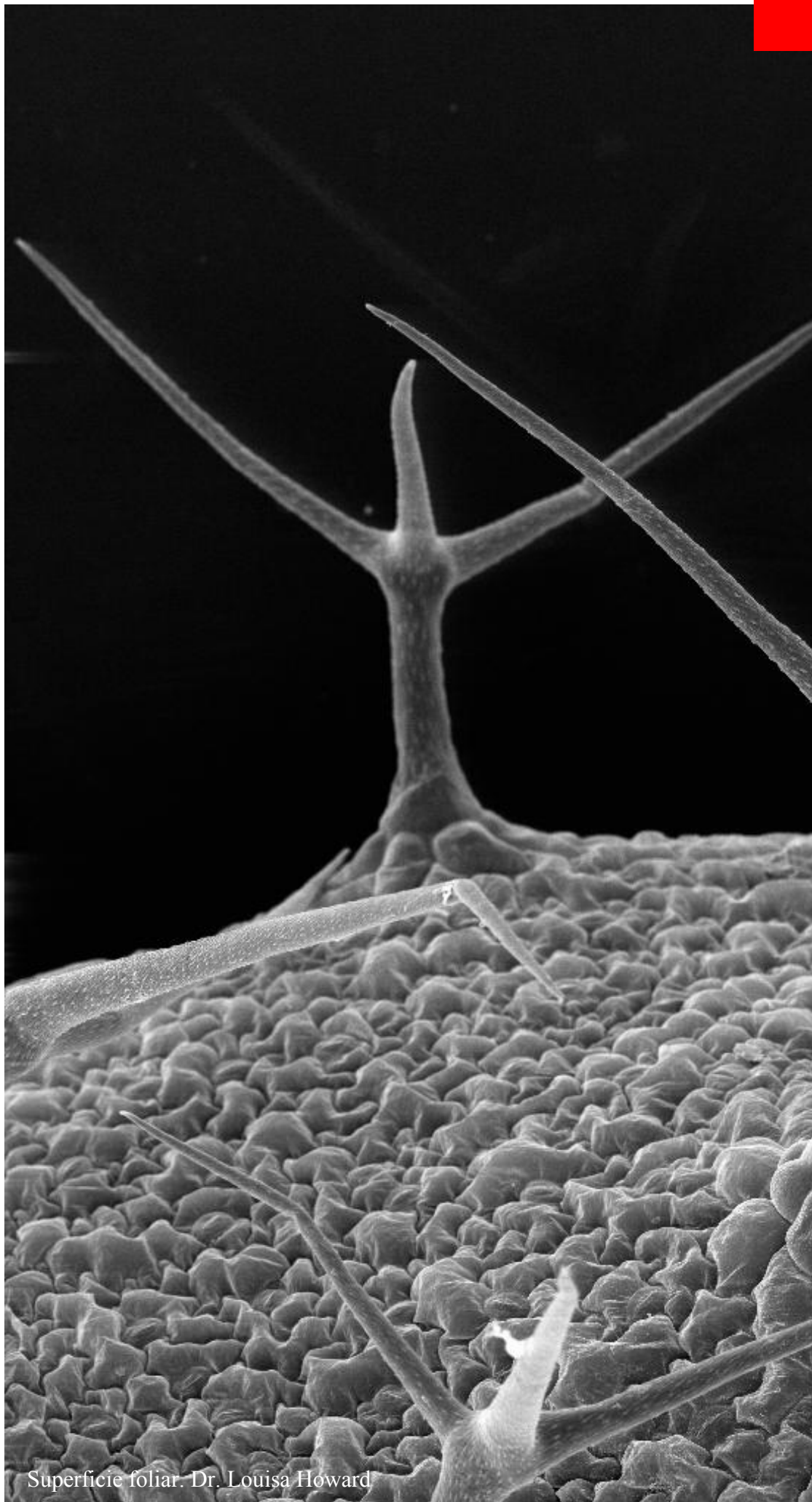
1.7 *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA RUTA DE LA UBIQUITINA EN PLANTAS.

Arabidopsis thaliana es una pequeña crucífera que gracias a su reducido tamaño, pequeño genoma y fácil manipulación genética ha llegado a ser uno de los más importantes sistemas para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. Sus características únicas ofrecen una serie de ventajas a la hora de considerarla como modelo de investigación. Es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógama, y produce numerosas semillas que permanecen viables durante varios años a temperatura ambiente (Gómez-Campo, 1976). Por el tamaño final de la planta (30 cm aproximadamente) permite siembras de hasta 10.000 plantas/m² (Meyerowitz, 1987). Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios. Los cruzamientos son relativamente fáciles de realizar y sencillos de mantener (por su capacidad de autofecundación). Su compacto genoma, con relativamente escasas secuencias repetidas, y un bajo contenido en ADN (aproximadamente 100 Mb por núcleo haploide, unas 25 veces el tamaño del genoma de *Escherichia coli*), la hacen con diferencia, la planta superior de genoma más pequeño conocido, y por lo tanto, un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares. Puede ser fácilmente transformada utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, y mediante el plásmido Ti es posible introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable. Por ejemplo, mediante la transformación de plantas con fusiones de los promotores de genes de interés a genes marcadores como el GUS permite un estudio de la expresión espacio-temporal relativamente simple. Además, los genes de estudio pueden ser sobreexpresados o bloqueados fácilmente mediante promotores constitutivos, o mediante la transformación con genes antisentido o microARNs artificiales. *Arabidopsis thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en anatomía, morfología, crecimiento, desarrollo y respuesta al

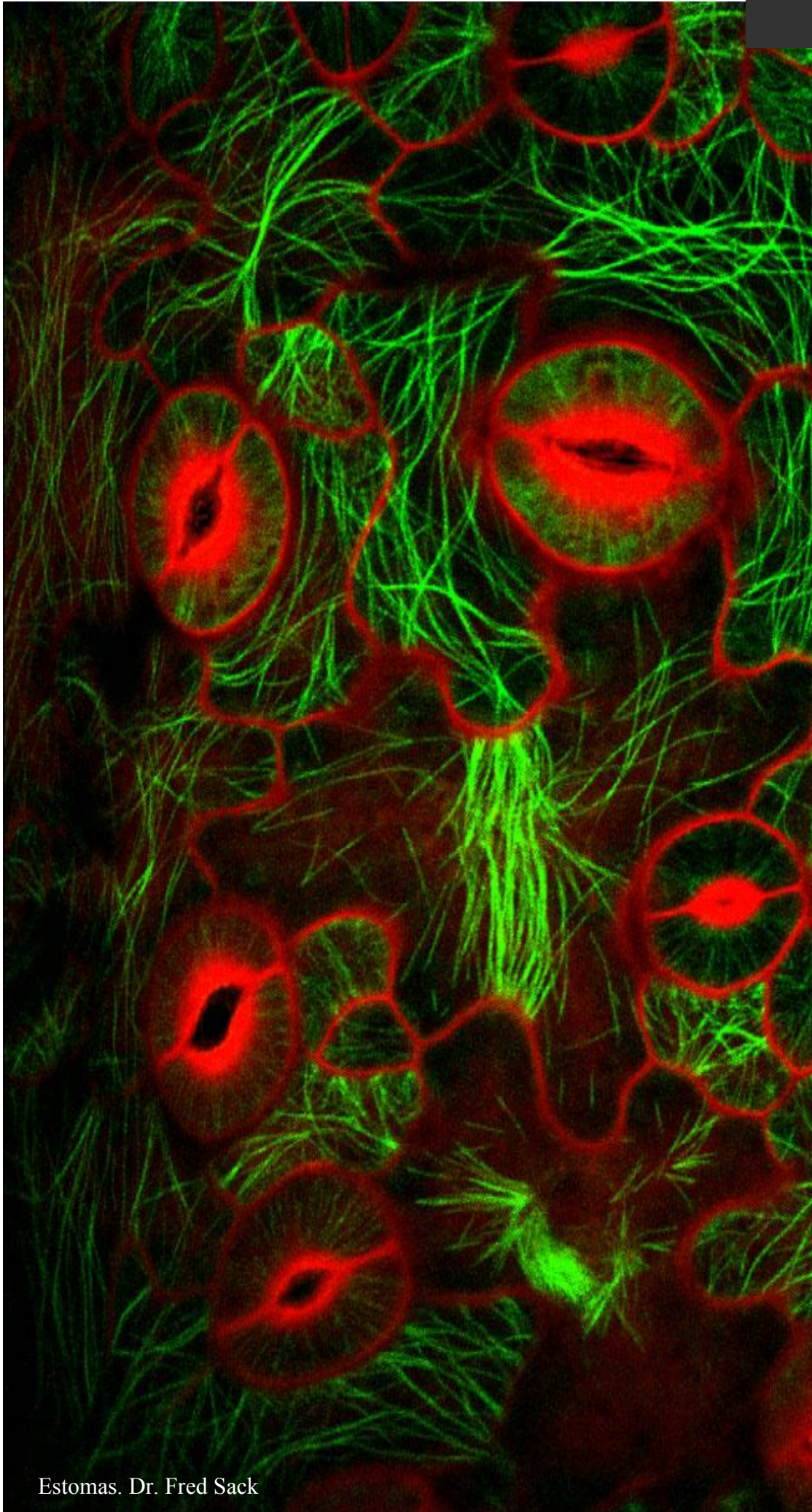
ambiente, por lo que los resultados obtenidos en investigación con esta especie son potencialmente aplicables a cualquier otra planta (Meyerowitz, 1989).

La simplicidad del genoma de *Arabidopsis*, el hecho de que este se haya secuenciado rápidamente, la existencia de centros de conservación, distribución de estirpes y de clones de ADN (NASC, ABRC, SENDAI) y el desarrollo de numerosas herramientas informáticas, la hacen muy atractiva no sólo para estudiar la regulación y función específica de los complejos SCF^{SKP2}, identificar las proteínas diana reguladas por estos complejos, determinar la función biológica de estas dianas y sus consecuencias en la respuesta hormonal, sino también transferir los resultados de la manipulación del sistema radicular a otras especies de interés agronómico.

En este trabajo se muestra que SKP2A forma parte de un complejo SCF. Hemos desarrollado un sistema *in vitro*, para poder demostrar además, por primera vez que un SCF de plantas tiene actividad E3 ubiquitina ligasa. Asimismo, hemos encontrado que SKP2A se regula por proteólisis a través de la ruta ubiquitina/proteasoma 26S y su estabilidad es dependiente de la respuesta a auxinas. Por otro lado, SKP2A participa en el control de la división celular durante el desarrollo y en respuesta a señales hormonales o nutricionales. Por último, hemos comprobado que la proteína SKP2A tiene capacidad para unir auxinas de forma directa, siendo probablemente esta unión un mecanismo de regulación de la proteína.



1. Función del gen *SKP2A* en el ciclo celular y en desarrollo radicular.
2. Análisis funcional de *SKP2A*.
3. Estudio de la respuesta de *SKP2A* en condiciones de estrés abiótico.
4. Conexión entre la respuesta a las auxinas y *SKP2A*.



3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) para generar las líneas transgénicas.

Cepas de bacterias y levaduras

Bacterias:

- Los clonajes se realizaron en *Escherichia coli* cepa DH5 α .
- La propagación de los vectores Gateway se realizó en la cepa DB3.1.
- Para la infección en plantas se usó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.
- En la inducción de proteínas se usó la cepa BL21 pLys Rosetta de *E.coli*.

Levaduras: Cepa HF7c de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO

Crecimiento de plantas y cultivos celulares

	Casa Comercial
Agar Plant	DUCHEFA
macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
MES 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid	DUCHEFA
micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
Sacarosa	MERCK

Crecimiento de bacterias y levaduras

	Casa Comercial
Agar bacteriológico	PRONADISA
LB	DUCHEFA
YEPD	DIFCO

3.3 VECTORES

Casa Comercial	
pROK2	Baulcombe <i>et al.</i> , 1986
pDNR221	INVITROGEN
pGWB5	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGWB15	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pGBT8	CLONTECH
pGAD	BIOTECH
pDEST15	INVITROGEN
pDEST17	INVITROGEN

3.4 OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	POSICIÓN	OLIGO	USO
Attb	Sentido	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	Clonaje en vectores PENTRY
	Antisentido	5'-CCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT-3'	
Actina	Sentido	5'-ACGGTAACTTGTGCTCAGTGGTGG-3'	Control de carga de RT-PCR
	Antisentido	5'-TTGGAGATCCACATCTGCTGGAATG-3'	
SKP2-AB	Sentido	5'-CTAAACTTGGGATGGTGT-3'	RT-PCR
	Antisentido	5'-TAACAGACAGAGCAATGTACTC-3'	
SKP2A-3P	Sentido	5'-CTAAACTTGGGATGGTGT-3'	RT-PCR
	Antisentido	5'-CTCCATCAACATGATGTTTATA-3'	
MBP-SKP2A-T1	Sentido	5'-GGAGATAGAACCATGGTGTATGGGAGGAGAA-3'	TRUNCADA
	Antisentido	5'-CAAGAAAGCTGGGTTCGGTCAAATACGCAATAGC-3'	
MBP-SKP2A-T2	Sentido	5'-GGAGATAGAACCATGGTGTATGGGAGGAGAA-3'	TRUNCADA
	Antisentido	5'-CAAGAAAGCTGGGTCCATTACCCCATCACTG-3'	
MBP-SKP2A-T3	Sentido	5'-GGAGATAGAACCATGGTGTATGGGAGGAGAA-3'	TRUNCADA
	Antisentido	5'-CAAGAAAGCTGGGTCTGTTATGTTTCTGCAATAG-3'	
MBP-SKP2A-T4	Sentido	5'-GGAGATAGAACCATGGTGTATGGGAGGAGAA-3'	TRUNCADA
	Antisentido	5'-CAAGAAAGCTGGGTTCGAAACAGCTTGAACCGC-3'	
MBP-SKP2A-[S151A]	Sentido	5'-AAACTCAACCTTGCCGGCTGCACT	MUTANTE
	Antisentido	TCATTGCGCGCCACTGCTATTGCG-3'	
MBP-SKP2A-[L128S]	Sentido	5'-CTCAGCAAAAAGCTCGAAAATTACAGACCG3'	MUTANTE
	Antisentido	-----	

3.5 ANTICUERPOS

	Animal de producción	Proteína detectada	Casa comercial o donante
α -knolle	Conejo	Knolle (Lauber <i>et al.</i> 1997)	G. JURGENS
α -HA	Ratón	Epítipo HA	ROCHE
α -GFP	Ratón	Epítipo GFP	ROCHE
FICT- α -conejo	Cabra	Anticuerpos de conejo	MOLECULAR PROBES
c-Myc 9E10	Ratón	Epítipo MYC	SANTACRUZ CO
c-Myc 9E10-biotinilado	Ratón	Epítipo MYC	SANTACRUZ CO
Streptavidin peroxidase		Moléculas biotiniladas	GE HEALTHCARE

3.6 SOLUCIONES Y TAMPONES

- **tampón GUS:** 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0, 40 nM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 40 nM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,004% de tritón X-100 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucurónico (X-Gluc).
- **tampón Laemmli** 10mM de EDTA, 0,1% xilencianol, 0,1 % azul de bromofenol, y 30% de glicerol.
- **tampón MTSB** (50 mM PIPES pH 6.9, 5 mM MgSO_4 , 5mM EGTA)
- **tampón TAE 50x** Tris-acetato 2M pH 8,3, 59,1ml de ácido acético frío, EDTA 0,5M.
- **tampón TAP** 50 mM Tris-HCl pH 7,4 , 150 mM CLNa , 10% glicerol, 0,1% NP-40.
- **tampón TBE 1x** 89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA.
- **tampón TBS** 0.5:100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.5% de NP-40.
- **tampón TE** 10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM de EDTA.
- **tampón para electroforesis de proteínas SDS-PAGE 10x** 0,025M Tris-HCl, 0,2M glicina, 0,1% SDS. Enrasar hasta 1L de agua MQ. pH 8,3. Diluir a 1x para su uso.
- **tampón de transferencia 10x** 25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3. Para su uso 1x, diluir en agua MQ y añadir metanol al 20% de la concentración final.

3.7 OTROS REACTIVOS

	Casa comercial
2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)	DUCHEFA
3AT (3-amino-1,2,4- trizol)	SIGMA
5-HYDROXY-1,4-NAPHTHOQUINONE	ALDRICH
ABA (ácido abscísico)	DUCHEFA
Agarosa	PRONADISA
Acrilamida	BIORAD
Antibióticos	DUCHEFA
ATP (adenosín trifosfato)	SIGMA
Benzamidina	SIGMA
Bradford	micro BCA de PIERCE
Cantharidine	SIGMA
Citifluor	AGAR Scientific
Cilcoheximida	DUCHEFA
Chemiblocker	MILLIPORE
Creatina kinasa	SIGMA
Cóctel inhibidor de proteasas vegetales	SIGMA
DMSO (dimetilsulfóxido)	SIGMA
Driselasa	SIGMA
DTT (ditiotreitól)	SIGMA
E1 enzima activadora de ubiquitina	BIOMOL
Sustrato quimioluminiscente HRP	MILLIPORE
Enzimas de restricción/modificadoras del ADN	ROCHE, FERMENTAS
Epoxomicina	AFFINITY
Etanol	BAKER
Bacteriófago ϕ 29	FERMENTAS
Fosfocreatina	SIGMA
Glicerol	MERCK
IAA (ácido indol-3-acético)	DUCHEFA
IAA-H ³ (ácido indol-3-acético tritiado)	AMERICAN RADIOLABELED CHEMICALS
Isopropanol	BAKER
Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone)	SIGMA
K ₄ Fe(CN) ₆	DUCHEFA
Membranas de nitrocelulosa	AMERSHAM
Metanol	BAKER
MG115	BIOMOL
MG132	BIOMOL
MgCl ₂	DUCHEFA
MgSO ₄	DUCHEFA
Na ₂ HPO ₄	DUCHEFA

NaCl	MERCK
NaH ₂ PO ₄	DUCHEFA
NP-40	FLUKA BIOCHEMIKAL
PBS (tampón fosfato salino)	SIGMA
Péptido MYC	SIGMA
PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo)	ROCHE
Resina Amylosa (MBP)	NEW ENGLAND BIOLABS
Resina de estreptavidina-agarosa	SIGMA
Roscovitina	SIGMA
Silvet L-77	LEHLE SEEDS
Syber Green I	ROCHE
Syber Safe INVITROGEN	INVITROGEN
Tampón Start	BECKMAN COULTER
Tiourea	AMERSHAM
Tris-HCl	DUCHEFA
Tritón X-100	SIGMA
Trizol	INVITROGEN
Tween-20	SIGMA
Ubiquitina biotinilada	BIOMOL
Urea	AMERSHAM
Vanadate-molybdate	SIGMA
X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactopiranosido)	DUCHEFA
X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-glucurónico)	DUCHEFA
Yoduro de propidio	SIGMA



Arabidopsis thaliana

4.1 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Extracción y análisis de ADN

La extracción de ADN plasmídico y las digestiones con enzimas de restricción se realizaron según el protocolo de Sambrook *et al.*, 1989. Las enzimas de restricción se utilizaron según las recomendaciones de la casa comercial.

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa al 1.2% usando un patrón de bandas de peso molecular conocido, y tiñendo con Syber Safe. El patrón de bandas se visualizó con el sistema de documentación de geles *Gel-Doc* (BIORAD).

Extracción y análisis de ARN

El material vegetal se homogenizó en nitrógeno líquido y el ARN se extrajo con trizol. Tras 5 minutos a temperatura ambiente (RT) se añadió cloroformo y se centrifugó durante 10 min/RT. La fase soluble se traspasó a tubos nuevos y se precipitó el ARN con isopropanol. Finalmente se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua filtrada y autoclavada, libre de ADNasas/ARNasas.

Los niveles de expresión de los ARNs extraídos se analizaron mediante qRT-PCR a tiempo real mediante el sistema de RT-PCR INVITROGEN ThermoScript RT con Syber Green I (ROCHE) o mediante RT-PCR semiQ con el kit *RT-un paso* (INVITROGEN). Se cuantificó la presencia de actina de los ARN en cada alícuota para normalizar las muestras. La expresión de los genes se analizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos diseñados para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, diseñando estos oligonucleótidos en los pasos intrón-exón.

4.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Condiciones de cultivo de las plantas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en una mezcla de sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1), o en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para cultivo *in vitro*. En el caso del cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución con lejía al 50% y se aclararon hasta tres veces con agua estéril. A continuación, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa al 1% y Plant-agar al 0.7% en

placas Petri para crecimiento en horizontal. Para los estudios radiculares las semillas se crecieron en vertical en placas cuadradas con un 1% de Plant-agar.

Las cámaras de cultivo *in vitro* presentaban las siguientes condiciones: 22°C de temperatura, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca fría y fotoperiodo de día largo (16h luz/8h oscuridad). Para seleccionar plantas transgénicas provenientes de una transformación se añadieron antibióticos a las placas Petri a una concentración final de 50 µg/ml.

Condiciones de cultivo de bacterias, obtención de competentes y transformación de *E. coli*

El crecimiento de las cepas bacterianas de *E.coli* se realizó en medio LB a 37°C durante 12 horas, con el correspondiente medio selectivo, y en agitación en el caso de medios líquidos.

Las células competentes se elaboraron según el protocolo de Sambrook *et al.*, 1989, y la transformación de células por el método de Birnboim y Doly, 1979.

Condiciones de cultivo y transformación de levaduras

Las levaduras se crecieron en medio YEPD (DIFCO) a 30°C a 200 rpm. La transformación de levaduras se realizó por el método polietilenglicol (Gietz *et al.*, 1995)

4.3 PLANTAS SOBREEXPRESORAS Y TRANSGÉNICAS

Las plantas transgénicas que sobreexpresan la proteína de fusión MYC-SKP2A (MYC-SKP2A^{OE}) se obtuvieron fusionando el cDNA de SKP2A (At1g21410) a seis copias del epítipo MYC en amino terminal. Esta construcción se clonó en el vector binario pROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986). Para realizar la construcción SKP2A-GFP se clonó el cDNA de SKP2A en el vector Gateway (INVITROGEN) pDNR221, y posteriormente se subclonó en un vector binario Gateway pGWB5 mediante el método de recombinación por LR.

Las plantas transgénicas de CYCB1-GUS se generaron por la fusión del promotor de *CYCB1;1*, al fragmento amino terminal de la CYCB1, que contiene el motivo de degradación de la proteína, al gen reportero *uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Éstas líneas CYCB1-GUS, que sólo se detectan en células en fase G2/M, se

cruzaron con dos líneas independientes de MYC-SKP2A para generar CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE}.

La obtención de las plantas transgénicas se realizó mediante el método de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) y posterior infiltración de plantas de *Arabidopsis* (Clough y Bent, 1998). Las semillas se plaquearon en medio MS con el antibiótico necesario para seleccionar las plantas transgénicas. Posteriormente, la descendencia T2 se volvió a seleccionar en presencia del antibiótico para identificar aquellas con una única inserción del transgen.

Para generar las plantas *axr1-12*/MYC-SKP2A^{OE}, *slr1-1*/MYC-SKP2A^{OE}, *axr2*/MYC-SKP2A^{OE}, *axr3*/MYC-SKP2A^{OE}, *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE} y *tir1-1*/MYC-SKP2A^{OE} se cruzaron plantas mutantes de *axr1-12*, *slr1-1*, *axr2-1*, *axr3-1*, *aux1-7* y *tir1-1* con plantas MYC-SKP2A^{OE}. Se realizaron sucesivos cruzamientos hasta obtener líneas con niveles de mRNA MYC-SKP2A similares a los parentales, comprobados mediante RT-PCR.

4.4 TINCIÓN HISTOQUÍMICA GUS

Se crecieron semillas de la generación T2 en placas Petri verticales, y se tiñeron usando un tampón GUS: 5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0, 40 nM K₄Fe(CN)₆, 40 nM K₃Fe(CN)₆, 0,004% de tritón X-100 y 5 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-glucurónico (X-Gluc). La reacción se detiene con etanol al 70%. Las muestras se conservan en PBS 1x con glicerol 50% y 20% de etanol.

4.5 CULTIVOS DE CÉLULAS SINCRONIZADAS

Las células de *Arabidopsis* (MMD2) se sincronizaron en la fase G0 mediante cultivos con déficit de sacarosa (Menges y Murray, 2002), y su posterior re-adición al medio, contándose este punto como tiempo cero (tpo=0). Posteriormente se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos de los que se extrae el ARN. Este ARN se analizó mediante RT-PCR usando marcadores de ciclo celular como son la *HISTONA H4* (marcador de la fase S) y la *CICLINA B1;1* (marcador de la fase G2/M).

4.6 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Las semillas de plantas MYC-SKP2A^{OE} se crecieron durante 4 días en condiciones de día largo. Las plántulas se machacaron en nitrógeno líquido y se extrajeron las proteínas totales con tampón TBS 0.5 (100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.5% de NP-40, 1 mM de PMSF, 1x del cóctel inhibidor de proteasas vegetales e inhibidores del proteasoma (4 nM de epoxomicina, 25 μ M de MG132 y 25 μ M de MG115). Los extractos se sonicaron 3 x 10 segundos en frío y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron y se filtraron con filtros de 0.8 μ m.

Para inmunoprecipitar la proteína MYC-SKP2A estos extractos se incubaron 1h a 4°C con 0.4 μ g del anticuerpo 9E10-biotinilado, tras lo cual se adicionaron bolas de estreptavidina-agarosa durante 1h más. Las bolas se lavaron 4 veces durante 15 minutos con el mismo tampón de extracción. Las proteínas MYC-SKP2A, y otras que estén interaccionando con ellas, se liberaron mediante la incubación de las bolas con 0.5 μ g/ μ l del péptido MYC durante 90 minutos. Posteriormente se procedió a su análisis por immunoblotting o para su uso en reacciones bioquímicas.

En otros casos, las proteínas inmunopurificadas se liberan con tampón Laemmli y se hierven a 100 °C/ 4min. Estas proteínas se analizan mediante inmunodetección.

4.7 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas de interés se clonaron en fase de lectura en vectores que expresan bien la proteína GST (*Glutation –S– transferasa*) o la proteína MBP (*Maltosa binding protein*). Estas proteínas de fusión se expresaron en la cepa BL21 Rosetta de *E.coli*. La inducción de proteínas se realizó con IPTG 0,4 mM durante 2 h a 37°C. El cultivo se centrifuga y se resuspende en una solución de PBS-Tween 20 0,1%, 1mM PMSF y 25 μ M de benzamidina. Las muestras se sonicaron en frío 3 x 15 segundos y se incubaron con bolas pre-lavadas de GST o MBP durante 1h en agitación a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 x 10 minutos en agitación a 4°C con PBS-Tween 20 0,1% y se conservaron en esta solución con un 10% de glicerol a -80°C. Las proteínas se cuantificaron por western-blot usando geles SDS-PAGE, teñidos con Sypro-Ruby o azul de *coomasie*.

4.8 ENSAYOS DE ACTIVIDAD E3 UBIQUITÍN-LIGASA

Los cDNAs de las enzimas E2 UBC8 y UBC13, se clonaron en el vector pGEX (AMERSHAM) para generar las proteínas recombinantes GST-UBC8 y GST-UBC13, que se expresaron en bacterias *E. coli* BL21 bajo las condiciones estándar descritas anteriormente. Las proteínas recombinantes fueron conservadas a -80°C en una solución 50 mM de glutatión reducido, 20 mM de Tris-HCl, 20 mM de NaCl y 5% de glicerol.

Para los ensayos de activación de la ubiquitina, se realizaron reacciones con 100nM de levadura E1, 0.1 µg de GST-UBC8 ó GST-UBC13, ATP 10 mM, 0.1 mM de DTT, 5 mM MgCl₂ y 0.5 µg de ubiquitina marcada con biotina (Ub-biot). Esta reacción se incubó durante 30 minutos a 30°C y posteriormente se paró con tampón de Laemmli sin β-ME para analizar enlaces tiol-éster, o con 1/20 v/v de β-ME para analizar modificaciones estables con Ub-biot.

Para analizar la actividad E3 ligasa de MYC-SKP2A, la proteína MYC-SKP2A se inmunoprecipitó según el protocolo descrito en el apartado de “ensayos de inmunoprecipitación”, usando 1 mg de la proteína total del extracto de plántulas MYC-SKP2A^{OE} de 4 días. El complejo SCF^{MYC-SKP2A} se aisló de las bolas de estreptavidina-agarosa por competición con el péptido MYC en un volumen final de 20 µl. Para cada ensayo de E3 ligasa se usó una mezcla de 2 µl del complejo SCF^{MYC-SKP2A}, levadura E1 100 nM, 0.1 µg de GST-UBC8 ó GST-UBC13, 10 mM de ATP, 0.1 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂ y 0.5 µg de Ub-biot, que se incubó durante 45 minutos a 30°C y otros 10 minutos a 100°C con tampón de carga 4x + ¼ β-mercaptoetanol + 100 mM de DTT.

En ambos ensayos se analizaron las proteínas por western-blot usando geles SDS-PAGE. La transferencia se realizó durante 1 hora por el sistema semiseco de AMERSHAM y utilizando membranas de PVDF. La membrana se bloqueó durante 1h con una solución 3% de BSA en PBS-T (PBS 1x con 0.1% de Tween-20). Posteriormente, las membranas se incubaron durante 45 minutos con streptavidine-horseradish-peroxidase (SIGMA) dilución 1:5000, y se revelaron mediante quimioluminiscencia.

4.9 ENSAYOS DE LACZ E HIS3

En los experimentos de dos híbridos de levaduras se usaron plásmidos pGAD y pGBT8, adaptados al sistema Gateway para generar las distintas construcciones por recombinación. El promotor de la alcohol deshidrogenada I (*AdhI*) se fusionó al dominio de activación de ADN (GAL4D; vector pGAD) o al dominio de unión de ADN (Gal4BD; vector pGBT8) para generar fusiones con *ASKs* y *SKP2A* ORFs. El cDNA codificante para ASK1, ASK2, ASK6, ASK8, ASK10, ASK14, ASK18 y SKP2A se introdujo en el vector Gateway pDNR221. Los cDNAs de los distintos ASK se transfirieron a pGAD y el de SKP2A a pGBT8. Se usaron cadenas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* HF7C con genes reporteros *LacZ* e *HIS3* bajo el control del promotor truncado de Gal1 que contiene elementos de respuesta a Gal4 (Gal1UAS). Tras la transformación, las levaduras se crecieron en medio selectivo sin histidina. Las colonias que crecieron en el medio se analizaron mediante la inducción de la actividad β -galactosidasa, incubando las células en placas con X-Gal (80 μ g/ml) durante 3 días. Aquellas levaduras productoras de β -galactosidasa que se tiñeron de azul, fueron consideradas como “positivas en interacción”.

4.10 TRATAMIENTOS DE PLÁNTULAS DE ARABIDOPSIS CON AUXINAS, ABA Y NaCl

Para analizar el efecto de diferentes hormonas, se crecieron plántulas MYC-SKP2A^{OE} durante seis días en medios sólido MS, y posteriormente en distintos medios líquidos de MS con 1 μ M de 2,4-D ó 10 μ M de ABA ó 150 mM de NaCl, con/sin 100 μ M de cicloheximida. Posteriormente, las plantas tratadas se incubaron con/sin inhibidores del proteasoma en el medio (4 nM de MG115 y 25 μ M de MG132) y se realizó la extracción total de proteínas para su análisis mediante inmunodetección.

4.11 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.

Degradación in vitro

Para analizar la estabilidad de la proteína MYC-SKP2A, se crecieron plantas durante 5 días en medio MS y se extrajo la proteína total en una solución 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM PMSF, 1x del cóctel de inhibidores de proteasas de plantas. Los ensayos de degradación de proteína se realizaron tomando 20 µl de los extractos de proteína total en tampón de extracción: 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM PMSF, 1x del cóctel de inhibidores de proteasas de plantas, por duplicado, a las que se adicionaron inhibidores del proteasoma (4 nM epoxomicina, 25 µM MG115 y 25 µM de MG132) o bien DMSO como control. Además, en todas las reacciones se añadió a concentración final: ATP 5 mM, DTT 0.2 mM, 5 mM Cl_2Mg , ubiquitina 0,05 µg/µl, creatina kinasa 0.01 U/µl y 5 mM de fosfocreatina. Las muestras se incubaron a 30° C durante diferentes tiempos (20, 40, 60, 90 y 120 minutos). Finalmente, la reacción de degradación se paró hirviendo las muestras durante 4 minutos en tampón Laemmli-SDS. Los resultados se analizaron por western-blot detectando MYC-SKP2A con un anticuerpo 9E10.

Degradación in vivo

Las plántulas de MYC-SKP2A^{OE} se crecieron durante 5 días en placas verticales de MS. Posteriormente, se transfirieron a matraces con 15 ml de MS líquido + 0,5 µM de cicloheximida, 15 ml de MS líquido + 2,4-D 10^{-6}M , 15 ml de MS líquido + 0,5 µM de cicloheximida + 2,4-D 10^{-6}M , 15 ml de MS líquido + 10 µM juglone, 15 ml de MS líquido + 10 µM juglone + 2,4-D 10^{-6}M y un control de 15 ml de MS líquido. Se cogieron muestras a tiempos 0h, 3h y 6h. Tras el tratamiento las plantas se secaronn y se machacaron con nitrógeno líquido. Finalmente se detectó la presencia de la proteína MYC-SKP2A mediante western-blot.

4.12 TRADUCCIÓN *IN VITRO*

Para el ensayo de traducción *in vitro* de las proteínas SKP2A y GFP, se utilizó el sistema de traducción/transcripción TNT (PROMEGA). Para realizarlo, adicionamos 1 µg de cada plásmido, junto [35S]-metionina o ácido [9, 10(n)-³H]-mirístico (GE Healthcare). Las reacciones se incubaron a 30°C durante 2 horas. Una vez traducidas, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, y el gel se desecó para poder obtener la señal radiactiva por autorradiografía.

4.13 MEDIDAS DE LOS PRIMORDIOS DE LAS RAÍCES LATERALES

Las semillas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} se crecieron durante 5 días en placas Petri verticales en medio MS. Posteriormente estas plántulas se tiñeron para observar su actividad GUS, revelando así los primordios de raíces laterales (PRL) en sus primeras divisiones. El número de PRL se analizó mediante microscopía (LEICA MZ9,5). Los resultados se representaron como n° PRL/ cm de raíz principal, utilizándose datos de dos experimentos independientes con 40 plantas cada uno. La longitud de la raíz principal se midió con el programa de imagen NIH Image 1.61.

4.14 TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO

Para teñir PRL en estadios tempranos, se llevaron a cabo tinciones con yoduro de propidio. Para ello se crecieron 20 plántulas durante 6 días en placas verticales con medio MS. Las plántulas se deshidrataron durante 20 minutos en etanol 96% y, posteriormente se re-hidrataron durante 5 minutos en agua MilliQ. La tinción con yoduro de propidio (10µg/ml) se llevó a cabo durante 10 minutos, después de los cuales las plantas se lavaron 2 veces las muestras con agua MilliQ. Las raíces de estas plantas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia, lo que nos permitió contar el número de PRL.

4.15 CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras se prepararon a partir del material vegetal, eliminando el nervio principal y procesándolas según el protocolo de Galbraith *et al.*, 1988. Los extractos se filtraron con filtros de 60 y 40 µm. La tinción de los núcleos aislados se realizó con 50 µg/ml de yoduro de propidio (SIGMA) durante 45 minutos. Los histogramas se generaron gracias a un citómetro de flujo FACScalibur (BIOSCIENCE).

4.16 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El tejido fresco de plantas se congeló en nitrógeno líquido y se analizó por criomicroscopía electrónica por el método LTSEM (Cryo Trans Oxford CT1599). El área de las células de la epidermis se midió con el programa NIH Image 1.61. Los valores mostrados corresponden a la media de las áreas de 400 células.

4.17 INMUNOLocalización DE PROTEÍNAS

Las inmunolocalizaciones se llevaron a cabo en plantas de 7 días crecidas en vertical (Lauber *et al.*, 1997). Las plantas se fijaron durante 1 hora con un 4% de paraformaldehído en tampón MTSB (50 mM PIPES pH 6.9, 5 mM MgSO₄, 5mM EGTA) en condiciones de vacío. Tras varios lavados, las raíces se colocaron en portaobjetos SuperFrost Plus de MENZER GLASER y se dejaron secar durante la noche. Las raíces se rehidrataron en MTSB y se permeabilizaron por digestión limitada de la pared mediante un tratamiento con 2% driselasa en MTSB durante 45 minutos a 37°C y posterior tratamiento con 10% DMSO, 3% NP-40 en MTSB. Para detectar la proteína KNOLLE, un marcador específico de citocinesis, se usó un anticuerpo primario α-KNOLLE generado en conejo a concentración 1:3000 (G. JURGENS) y un secundario FICT-α-conejo 1:500 (MOLECULAR PROBES). Las muestras se montaron con citifluor (AGAR Scientific) y se observaron mediante microscopía confocal (sistema Microradiance de BIORAD), acoplado a un microscopio vertical Axioskop2 (ZEISS).

4.18 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS EN AUSENCIA DE FOSFATO

Las semillas de MYC-SKP2A y silvestres se crecieron en medio MS sólido completo (sales de MS más sacarosa) durante 5 días, y posteriormente se transplantaron a un nuevo medio MS sin fosfato (micronutrientes MS, vitaminas MS y una mezcla de macronutrientes sin KH_2PO_4 de DUCHEFA). Por otro lado, estas semillas también se germinaron directamente en medio con ó sin fosfato durante 9 días. En ambos casos se midió la longitud de la raíz, el número de PRL y el peso fresco en grupos de 10 plántulas. El contenido de Pi se determinó por colorimetría según el método del sulfomolibdico (Jackson, 1958).

4.19 ANÁLISIS DE CRECIMIENTO EN AUSENCIA DE SACAROSA Y MANITOL

Las plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y el mutante de T-ADN *skp2a* (GABI-Kat. 293D12) se germinaron en placas MS crecidas durante 12d con distintas concentraciones de sacarosa (0%, 5%, 7% y 9%) o de manitol (0mM, 150mM y 300mM). Se sembraron 50 individuos de cada tipo por placa, y se realizaron tres repeticiones de cada concentración para cada tipo de experimento.

4.20 ENSAYOS DE RESISTENCIA A TEMPERATURA

Las plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* se sembraron durante 13 días a 22°C (16h luz/ 8h oscuridad) en medio MS (plantas control) o durante 5 días en medio MS en las mismas condiciones. A continuación, a estas plantas crecidas durante 5 días se les aplicó un tratamiento de 1 hora a 42°C en oscuridad, tapadas con papel de aluminio, o bien 30 minutos a 52°C, también tapadas. Tras ello, se dejaron crecer a 22°C (16h luz/ 8h oscuridad) durante 8 días más (tiempo total 13 días). Finalmente se analizó la elongación radicular en centímetros.

4.21 MEDIDA DE LA LONGITUD DEL HIPOCOTILO

Para estudiar la implicación de la proteína SKP2A en el crecimiento del hipocotilo, las semillas silvestres, SKP2A y *skp2a* se sembraron en condiciones de luz roja u oscuridad en placas de MS sin sacarosa, y vernalizadas 3 días en frío. Tras la vernalización, se sometieron a luz roja/OSC durante 4 días, o bien se les sometió a un pulso de luz blanca durante 3 horas. Las medidas se realizaron mediante fotografía utilizando para medir el programa Imagen 1.41.

4.22 ENSAYO DE UNIÓN Y COMPETICIÓN DE SKP2A A AUXINAS.

Generación de proteínas recombinantes silvestres, truncadas y mutantes.

Para analizar la unión de las proteínas SKP2A y SKP2B a las auxinas, utilizamos proteínas recombinantes expresadas en bacterias. Las proteínas MBP-SKP2A, MBP-SKP2B y vector vacío (MBP) (NEW ENGLAND BIOLABS) se expresaron en células de la cepa BL21 Rosetta de *E.coli*. Para analizar la cantidad de proteína unida a bolas de maltosa hervimos 20 µl de cada muestra con LB/βME a 100°C durante 4 minutos y las corrimos en un gel de proteínas PAGE-SDS. Las proteínas se tiñeron con *Coomasie-blue*, lo que permitió su cuantificación relativa y el análisis de su calidad.

Para generar las distintas versiones de las proteínas truncadas de SKP2A (T1, T2, T3 y T4), se hicieron delecciones progresivas de 50 en 50 aa a partir del extremo C-t. La región codificante se amplificó mediante PCR usando los cebadores adecuados para cada fragmento: T1 (1- 165 aa); T2 (1- 215 aa); T3 (1- 263 aa) y T4 (1- 314 aa) se clonaron en el vector Gateway pDNOR221. Posteriormente se secuenció el nuevo clon para asegurar la ausencia total de mutaciones puntuales indeseadas.

Los mutantes puntuales se generaron gracias al sistema de STRATAGENE QuickChange Multi Site Directed Mutagenesis Kit. Tras la mutagénesis, los clones resultantes se secuenciaron para descartar otro tipo de mutaciones no deseadas. Todos los clones fueron transferidos mediante el sistema Gateway al vector MBP por recombinación LR. Finalmente las construcciones se expresaron como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y se purificaron mediante bolas de amilosa, según el protocolo descrito anteriormente.

Ensayos de unión a auxina

Para los ensayos de unión a auxina se añadieron cantidades similares de cada una de las proteínas (unidas a bolas MBP) en 500 μ l de PBS-Tween 20 0,1% con una concentración constante de 50 nM IAA- H^3 con actividad específica 20 mCi/mmol. Esta mezcla se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados de 3 minutos, se adicionó a cada muestra 100 μ l de líquido de centelleo y se midió la cantidad de radiactividad retenida por las distintas proteínas en un contador de centelleo líquido (PERKIN ELMER MicroBeta TriLUX 1450 LSC) mediante desintegraciones por minuto (d.p.m.). Los valores representados corresponden a la media de de tres repeticiones independientes.

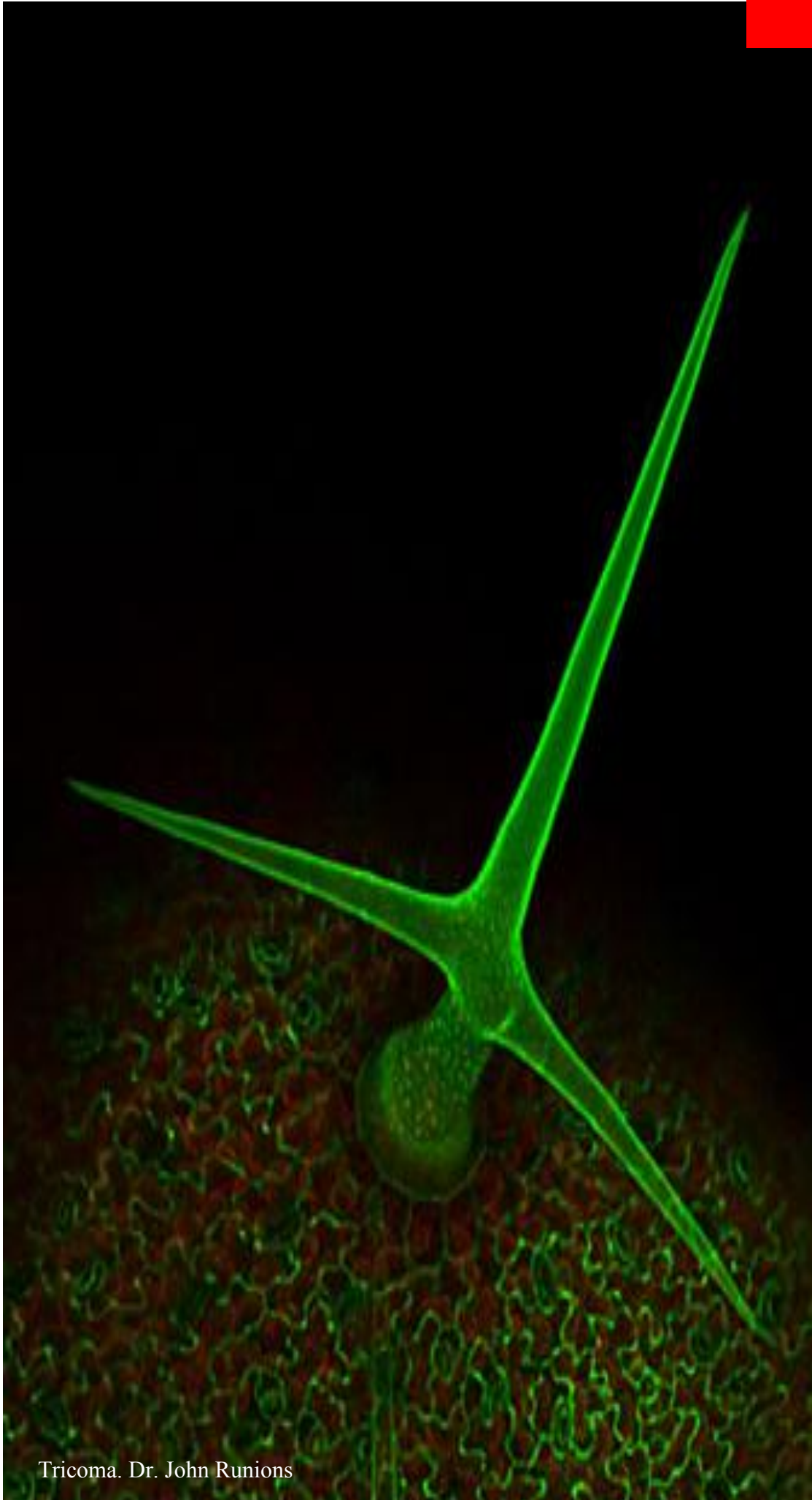
Ensayo de competición con [3H]-IAA y auxinas frías

Para los ensayos de competición con auxinas frías (IAA, 1-NAA y 2-NAA) (DUCHEFA) adicionamos en 500 μ l de PBS-Tween 20 0,1%, 50 nM [3H]-IAA) y diferentes concentraciones de auxinas frías, para cada tratamiento: 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M. Incubamos 1h a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de 3 minutos. Eliminamos el PBS-Tween20 0,1% y adicionamos 100 μ l de líquido de centelleo. Medimos d.p.m. en el contador de centelleo líquido (PERKIN ELMER MicroBeta TriLUX 1450 LSC). Los valores representados corresponden a la media de de tres repeticiones independientes.

Modelización estructural y cálculos teóricos para la generación de la estructura *in silico* de SKP2A

La herramienta de identificación de secuencias del servidor Swiss-Model (Arnold *et al.*, 2006) y el programa Swiss Model Project Model se usó para realizar los posibles modelos estructurales de las proteínas SKP2A y SKP2B a partir de la estructura conocida de SKP2 de humanos y del complejo SKP2-SKP1 (PDB entry 1FQV, cadena A), a partir de la cual se generaron los archivos con el programa Swiss-PdbViewer (Guex *et al.*, 1997). La superposición de estructuras y la selección espacial se realizaron también con el programa Swiss-PdbViewer. La geometría de la molécula de IAA se optimizó gracias a cálculos cuánticos B3LYP/6-311G(d,p) con el paquete Gaussian03 (Frisch *et al.*, 2004). Los primeros acoplamientos entre las estructuras de

IAA y SKP2A se realizaron mediante el programa DOCK 6.1 (Moustakas *et al.*, 2006), mientras que los estudios de mayor precisión se hicieron con el programa Chimera 1.3 (Pettersen *et al.*, 2004). En todas las optimizaciones se usaron cálculos de energía con el sistema AMBER (Case *et al.*, 2005). Los cálculos cuánticos de doble capa se realizaron mediante el paquete ONIOM (B3LYP/6-311G(d,p):HF/6-31G) (Dapprich *et al.*, 1999) de Gaussian03, para definir el sitio de unión con IAA. El potencial electrostático PB (Poisson-Boltzmann) se obtuvo mediante el programa APBS 0.4.0 (Baker *et al.*, 2001), asignando mediante AMBER las cargas atómicas, y mediante el programa de cálculos electrostáticos PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004) se incluyeron los radios de hidrógeno. Los cálculos en detalle (0,50-Å) dieron lugar a una red de 3.691 átomos que se usaron para resolver la ecuación del PB no lineal para mallas de puntos de tamaño 129x129x161 con constante dieléctrica 298.15 K para las dos proteínas, y con 78.54K para el agua. Los valores de potencial se dan en kT por unidad de carga, siendo k = La constante de Boltzmann, y T = Temperatura absoluta. Los potenciales PB de las superficies proteicas así como los modelos gráficos de realizaron gracias a PyMOL 1.1 (DeLano *et al.*, 2008).



ANTECEDENTES

La proteína de *Arabidopsis thaliana* SKP2A (At1g21410) se identificó en base a su homología con SKP2 de humanos, una proteína de tipo *F-box* que recluta diversos reguladores del ciclo celular para su degradación a través del sistema UPS. SKP2A contiene un motivo *F-box* en el extremo N-t y una región con repeticiones ricas de leucinas en el extremo C-t (figura 8). En plantas, SKP2A forma parte de un complejo SCF (*Skp1/Cullin/F-box*), y se ha descrito que degrada los factores transcripcionales de *Arabidopsis* E2FC/DPB que están implicados en el control de la división celular (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008). El genoma de *Arabidopsis* presenta otro gen, SKP2B (At1g77000), que tiene un 83% de homología de secuencia a nivel de aminoácidos con SKP2A. Es muy probable que ambos genes sean el resultado de una duplicación cromosómica.

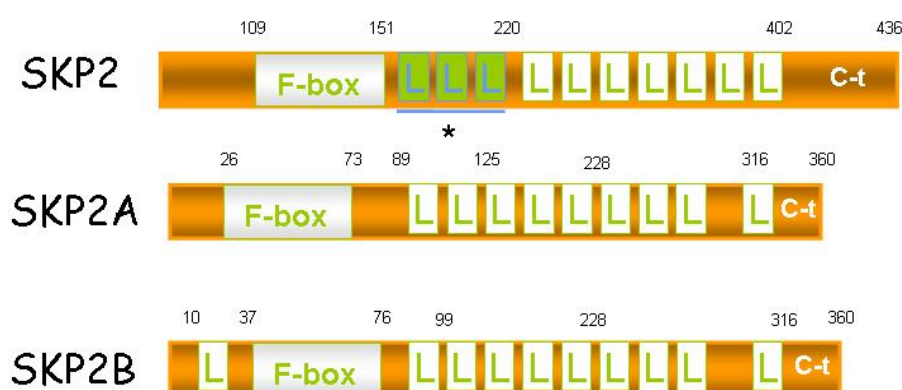


Figura 8: Representación esquemática de la estructura de las proteínas HsSKP2, AtSKP2A y AtSKP2B. El dominio *F-box* es el responsable de la interacción con las proteínas diana y se localiza en el extremo N-t. Las repeticiones ricas en leucina (LRR) marcadas con un asterisco se creen implicadas en el reconocimiento de las proteínas diana.

La región codificante de SKP2A está compuesta por una secuencia de 1391 pb que codifican para una proteína de 360 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 39613.5 Da y un punto isoeléctrico teórico (pI) de 7,3251 (Figura 9).

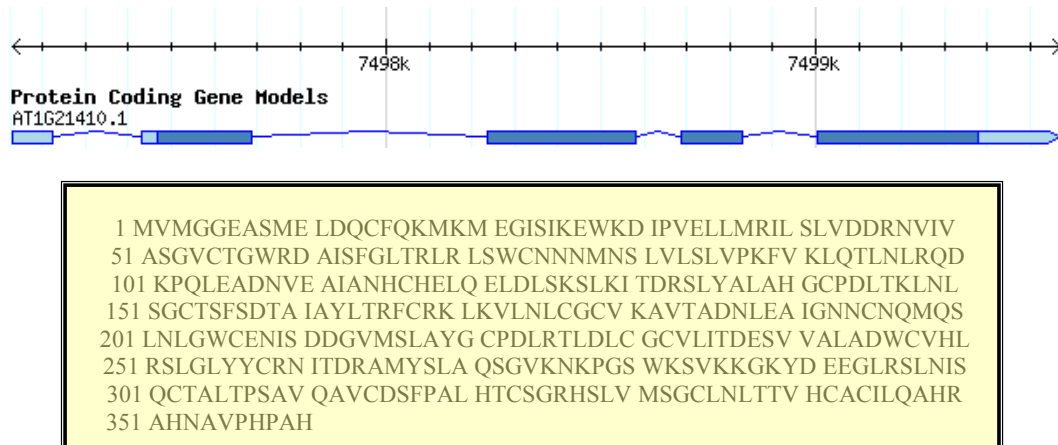


Figura 9: Representación esquemática de SKP2A y secuencia de aminoácidos. Datos obtenidos de www.arabidopsis.org.

Gracias a los datos cristalográficos existentes de la *F-box* SKP2 de humanos, se generó una estructura *in silico* de SKP2A. Esta estructura tridimensional consta de un dominio *F-box* formado por 3 hélices en la posición N-t, una gran zona de repeticiones de leucina (LRR) que abarcaría desde el residuo 46 al 302, y una cola de 30 residuos en posición C-t sin estructura definida. El dominio LRR está formado por 9 hélices en el lado convexo y 10 láminas β en el lado cóncavo (figura 10).

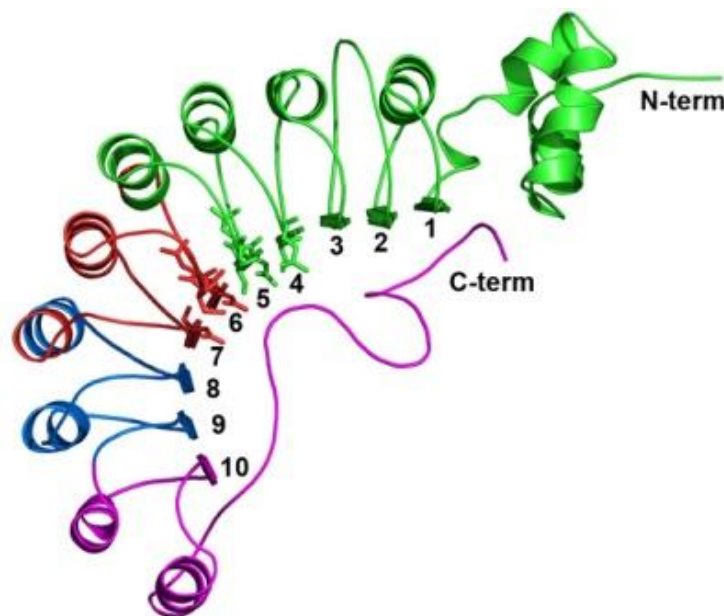


Figura 10: Modelo *in silico* de la estructura tridimensional de la proteína SKP2A realizado a partir de los datos cristalográficos de la proteína *F-box* SKP2 de humanos.

5.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SKP2A

5.1.1 Expresión espacio-temporal

Para entender mejor el papel de la proteína SKP2A en el desarrollo de las plantas, se realizó un análisis de la expresión espacio-temporal del gen codificante. Para ello, se analizaron plantas que portaban el promotor del gen *SKP2A* fusionado al gen reportero *GUS* (*SKP2A::GUS*). En la figura 11 se muestran los resultados de la tinción *GUS* para las plantas transgénicas *SKP2A::GUS* en diferentes estadios del desarrollo. *SKP2A* se expresó en altos niveles en las etapas tempranas de la germinación (figura 11a-c). En las plántulas, la expresión fue más intensa en las células pertenecientes a las áreas de división, los meristemos apical y radicular, y las primeras hojas (figura 11d-g), crecidas tanto en condiciones de luz como en oscuridad. En hojas maduras la tinción *GUS* más intensa se produjo en el tejido vascular, en los estomas y en las células de la base de los tricomas (figura 11h-i). En las flores, se mostró mayor expresión de *SKP2A* en el tejido vascular de los pétalos y los sépalos, y en el polen (figura 11j-k). En la raíz se expresó, principalmente, en las células de la *columnella* (figura 11l), y en los primordios de las raíces laterales (figura 11m-n). Es interesante remarcar que la tinción *GUS* desapareció cuando la raíz lateral empezaba a elongar y a separarse de la raíz principal (figura 11o-p), reapareciendo en las células de la *columnella* de la raíz madura.

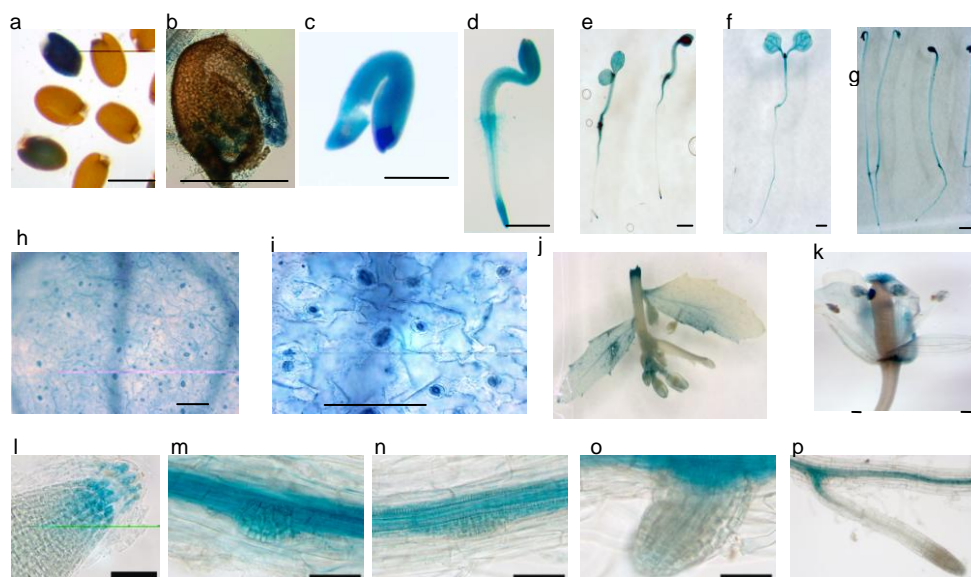


Figura 11. Análisis de la actividad *GUS* de plantas *SKP2A::GUS* en diferentes fases del desarrollo. **a-b:** Semillas, **c:** Embrión, **d:** Plántula de 1,5 días, **e:** Plántulas de 3,5 días, **f:** Plántulas de 5 días crecidas en luz, **g:** Plántulas de 7 días crecidas en oscuridad, **h:** Hojas de roseta de plantas de 21 días, **i:** Tricoma de hoja madura de roseta, **j:** Flores jóvenes y hojas caulinares, **k:** Flor madura, **l:** Raíz principal, **m-p:** Diferentes estadios del desarrollo de raíces laterales. Las barras corresponden a 0,05 mm.

5.1.2 Expresión de *SKP2A* durante el ciclo celular

Ya que *SKP2A* se identificó en base a su homología con HsSKP2, quien regula la división celular, y viendo que la expresión de *SKP2A* se expresaba fuertemente en meristemos, se decidió estudiar más en detalle la regulación a lo largo del ciclo celular. Para ello, se llevó a cabo un experimento de sincronización del ciclo celular en ausencia de sacarosa, en células en cultivo de *Arabidopsis* MMD2 (figura 12). Después de adicionar sacarosa al medio se tomaron muestras cada dos horas durante un periodo de 20 horas, por lo que se consiguió analizar prácticamente un ciclo celular completo. Para poder seguir la progresión del ciclo celular se usaron dos marcadores como son el gen de la *HISTONA H4*, que sirvió de control de la fase S, y el gen de la *CYCLINA B1;1* como control de la fase G2/M. En la figura 12 se observa cómo la fase S se extiende desde la hora 6 a la 10 (existiendo un pico de expresión de la *HISTONA H4* a las 8 horas) y a partir de la hora 12 se aumenta la expresión de la *CYCLINA B1;1*, hasta la hora 16. La expresión de *SKP2A* se regula a lo largo del ciclo de división celular, observándose picos de aumento de expresión tanto en fase S como en G2/M (8 y 14 horas), siendo el pico en G2/M el de mayor expresión.

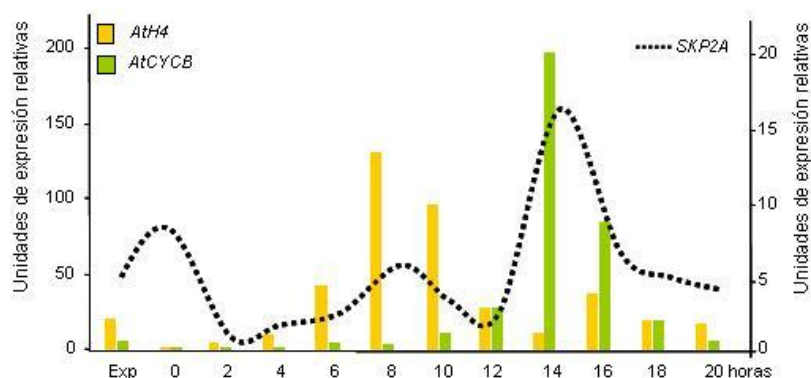


Figura 12: Expresión de *SKP2A* durante un ciclo celular completo. Se analizaron los niveles de expresión de *SKP2A* mediante sincronización del cultivo celular por sacarosa. Los niveles de ARNm de *SKP2A* se cuantificaron a diferentes tiempos por adicción de sacarosa en el medio. Se usaron controles de fase S (*HISTONA H4*) y de fase G2/M (*CYCLINA B1;1*). Los niveles relativos de la expresión de *SKP2A* se han incrementado 10 veces en la gráfica para facilitar la comparación con los controles.

5.1.3 Estudio de la función de *SKP2A*

Para intentar entender la función de *SKP2A* *in planta*, se identificó un mutante de T-ADN en la colección Gabi-Kat (GABI-Kat. 293D12). El análisis fenotípico de este mutante no reveló cambios fenotípicos visibles respecto a las plantas silvestres. Debido a esto, se decidió generar plantas que sobreexpresaran ectópicamente *SKP2A* fusionado al epítipo MYC, para poder seguir así la proteína (MYC-SKP2A), bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo. La comparación entre plántulas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} (entre 0 y 7 días) no reveló diferencias significativas entre ellas, pero a partir de los 14 días de crecimiento, el tamaño foliar de las plantas MYC-SKP2A^{OE} fue mayor que el de las silvestres (figura 13a). En plantas adultas, el tamaño de las hojas de las roseta de MYC-SKP2A^{OE} siguió siendo mayor que en plantas silvestres (figura 13b). Para discernir si este incremento se debía a un mayor número de células en las hojas, o bien, a un mayor tamaño de las células, se realizaron estudios con microscopía electrónica (figura 13c-d). Estos análisis mostraron que las plantas MYC-SKP2A^{OE} presentaban aproximadamente un 25% más células en sus hojas que las silvestres y, además, el tamaño de estas células era mayor que en las células de plantas silvestres (figura 13d). Por ello, se puede concluir que la diferencia de tamaño observada se debe tanto al aumento en el número de células, como al incremento de tamaño de las mismas.

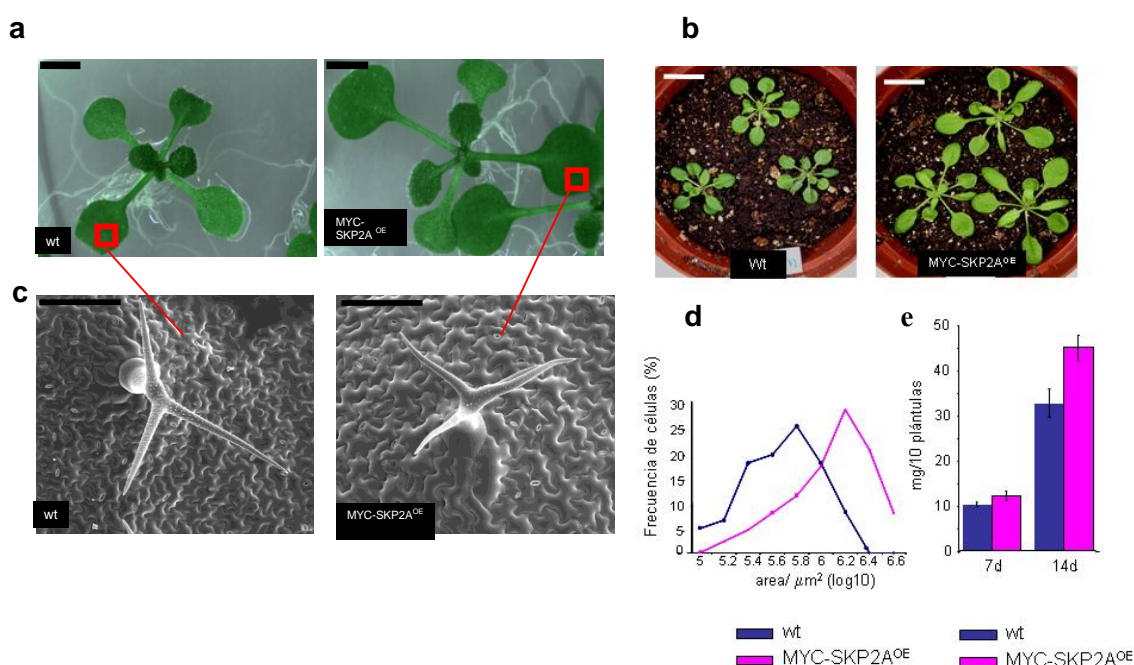


Figura 13. **a:** Plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} de 14 días. Las barras corresponden a 0,5 cm. **b:** Plantas de 24 días silvestres y MYC-SKP2A^{OE}. La barra corresponde a 2 cm. **c:** Fotografías de microscopía electrónica de hojas de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} de 14 días. Barra = 200 μm. **d:** Distribución del tamaño celular de hojas de roseta de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE}. **e:** Medidas del peso fresco de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} de 7 o 14 días.

Para analizar si el incremento de tamaño también estaba contribuyendo a un aumento en la biomasa de la planta, se llevaron a cabo estudios del peso fresco de las plántulas. Como se observa en la figura 13e la línea sobreexpresora de MYC-SKP2A generó aproximadamente un 60% más de biomasa fresca que las plantas silvestres. Otros estudios de fenotipo no mostraron diferencias significativas en el tamaño de los órganos florales, tamaño de silicuas o de las semillas.

5.2 SKP2A ES UNA PROTEÍNA NUCLEAR

Para determinar la localización de la proteína SKP2A se realizó una fusión de esta proteína a la proteína GFP. Esta quimera y el control GFP se expresaron en plantas bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (35S::GFP; 35S::SKP2A-GFP). Mediante microscopía confocal, se analizaron los meristemos apicales de las raíces de plántulas que expresaban SKP2A-GFP, y del control GFP. La proteína GFP se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras la localización de SKP2A-GFP fue mayoritaria en los núcleos de las células en división (figura 14). Estos datos indican que muy probablemente la función de la proteína SKP2A se esté llevando a cabo dentro del núcleo.

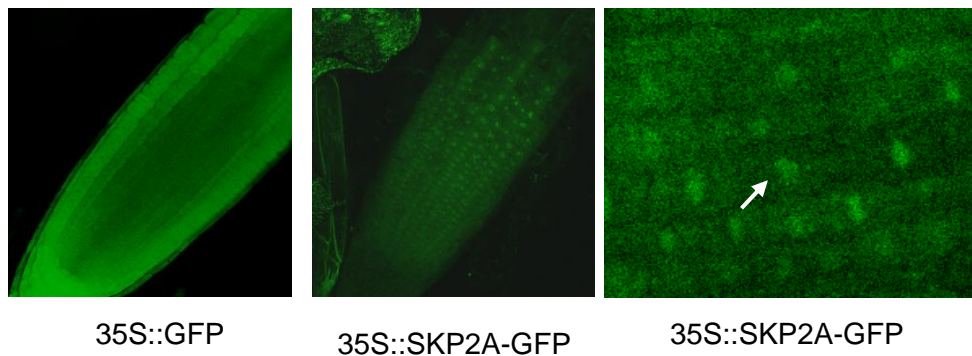


Figura 14: Análisis por microscopía confocal de meristemos radiculares de plantas sobreexpresoras de GFP o de SKP2A-GFP. La flecha indica la acumulación de SKP2A-GFP en los núcleos.

5.3 SKP2A ESTIMULA LA DIVISIÓN CELULAR EN LOS MERISTEMOS

En trabajos previos se había observado que SKP2A reclutaba a E2FC y a DPB para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (del Pozo *et al.*, 2002, del Pozo *et al.*, 2006). Estos datos sugerían que SKP2A podía estar formando parte de una enzima E3 ubiquitina ligasa implicada en la regulación del ciclo celular. Para poder analizar *in vivo* el papel de SKP2A en la división celular, se realizaron cruces entre líneas CYCB1-GUS con dos líneas independientes de MYC-SKP2A^{OE}. La línea CYCB1-GUS contenía el promotor del gen *CYCB1;1* y un dominio de degradación de la proteína CYCB1;1 fusionado a la proteína GUS. Esta construcción CYCB1-GUS se degradaba selectivamente y sólo se detectaba actividad GUS en células que estuvieran en la fase G2/M. Los análisis histoquímicos de la actividad GUS revelaron que en las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A aumentaba el número de células que acumulaban CYCB1;1 en meristemos radiculares y apicales, y en hojas jóvenes (figura 15a). Para discernir si este hecho era consecuencia de una estabilización de la proteína CYCB1-GUS, o realmente existían más células en división, se analizaron los niveles de la proteína KNOLLE, una proteína de metafase (Lauber *et al.*, 1997). Como se observa en la figura 15b, la proteína KNOLLE se detectó en un mayor número de células de los meristemos radiculares de plantas MYC-SKP2A^{OE} en comparación con las plantas silvestres. Estos resultados indican que la sobreexpresión de SKP2A promueve la división celular en áreas de proliferación. Asimismo, el número de células en fase G2/M en los meristemos radiculares de plántulas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} también presentaron diferencias. A los 3 días de crecimiento, un 50% de los meristemos de plántulas CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} tenían entre 7 y 13 células en fase G2/M. A los 7 días se observó que las plantas MYC-SKP2A^{OE} poseían mayor número de células en G2/M que las plantas control (figura 15c).

Posteriormente, se analizó si el incremento de la tasa de división estaba contribuyendo al crecimiento de la raíz principal. Como se muestra en la figura 15d, las raíces de las plantas sobreexpresoras fueron más largas que las control. Sin embargo, el tamaño medio de las células radiculares fue estadísticamente similar. Esto sugiere que las diferencias de tamaño en la raíz se deben posiblemente a un mayor número de células, como consecuencia de una mayor tasa de división celular.

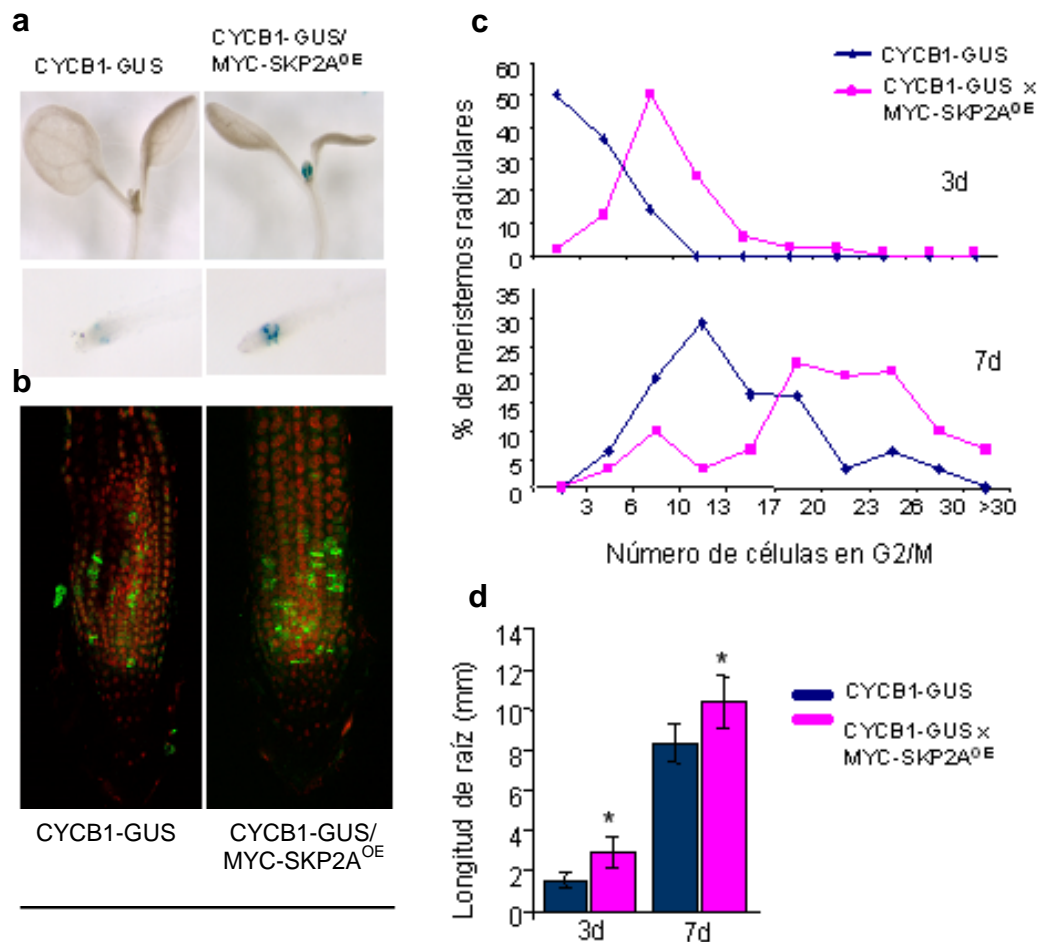


Figura 15. **a:** Tinciones histoquímicas GUS en plántulas de líneas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/ MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 5 días. **b:** Imágenes de microscopía confocal de los meristemos radiculares de plántulas de 3d de CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/ MYC-SKP2A^{OE}. La proteína KNOLLE se observa en verde. **c:** Número medio de células en fase G2/M en meristemos radiculares de CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/ MYC-SKP2A^{OE} de 3 y 7 días en medio MS (n=30). **d:** Medidas de la raíz principal en centímetros (cm) de 30 plántulas de CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/ MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 3 y 7 días en medio MS. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Estudios recientes han mostrado que la sobreexpresión del represor transcripcional E2FC reducía drásticamente los niveles de CYCB1-GUS en los meristemos (del Pozo *et al.*, 2006). Si SKP2A actúa promoviendo la degradación de E2FC, se esperaría encontrar mayor cantidad de CYCB1-GUS al sobreexpresar SKP2A. Para analizar esto *in vivo*, se compararon las tinciones GUS de plantas CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/E2FC^{OE} y CYCB1-GUS/E2FC^{OE}/MYC-SKP2A^{OE}. Como se observa en la figura 16a, el cruce con SKP2A rescató el fenotipo de CYCB1-GUS/E2FC^{OE}, sugiriendo que SKP2A estaba degradando el exceso de E2FC. Asimismo, mediante western-blot utilizando IgGs contra E2FC se observa que, efectivamente, las raíces de plantas que sobreexpresan MYC-SKP2A acumularon una menor cantidad de proteína E2FC (figura 16c).

Estudios previos revelaron que las plantas con niveles reducidos de la proteína E2FC presentaban menor ploidía que las plantas silvestres (del Pozo *et al.*, 2006) (figura 16a). Análisis mediante FACS de las plantas MYC-SKP2A^{OE} mostraron que estas también tienen niveles menores de ploidía que las plantas silvestres. Esto concuerda con la idea de que SKP2A degrade a E2FC *in planta*, reduciendo así los niveles de endorreplicación (figura 16d), ya que plantas con niveles reducidos de E2FC muestran una disminución en los niveles de ploidía (del Pozo *et al.*, 2006).

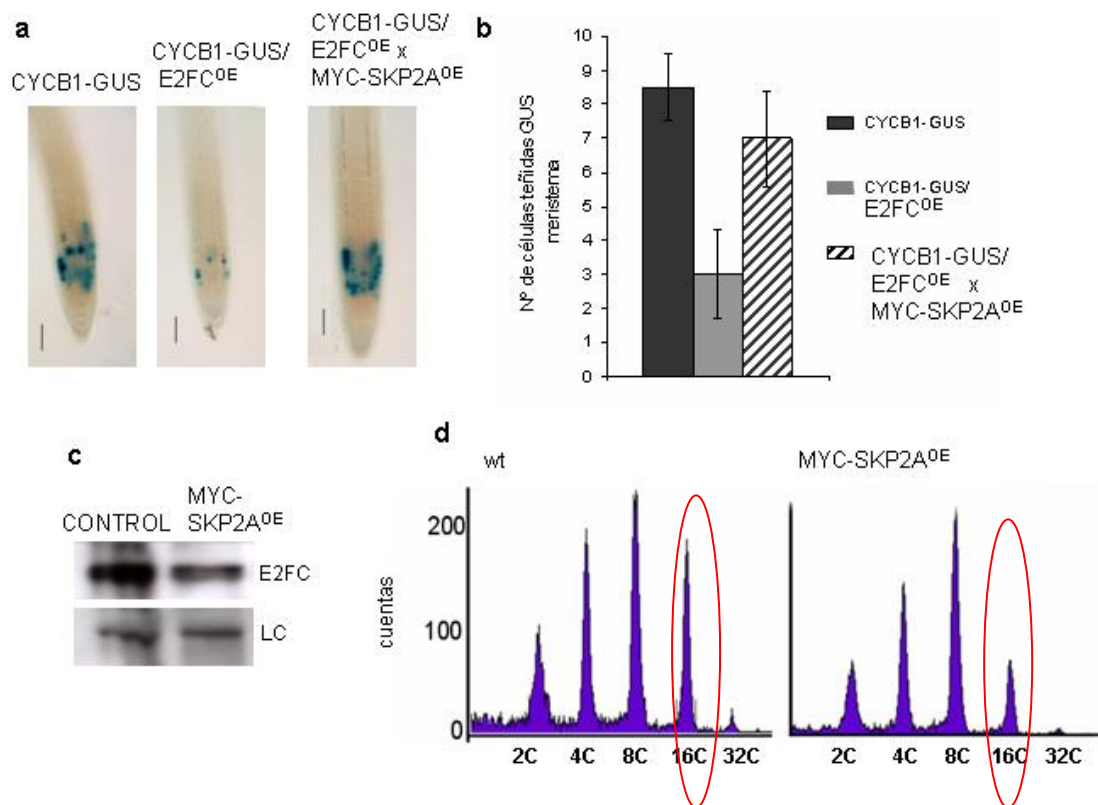


Figura 16. **a:** Tinción histoquímica GUS de meristemos radiculares de plantas de 5 días CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/E2FC^{OE} y CYCB1-GUS/E2FC^{OE}/MYC-SKP2A^{OE}. **b:** Cuantificación del número de células teñidas para actividad GUS por meristemo. **c:** Western-blot de proteínas extraídas de raíces de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} para analizar los niveles de E2FC. **d:** Distribución de la ploidía en núcleos de hojas de roseta de plantas de 14 días silvestres y MYC-SKP2A^{OE}. La elipse en rojo resalta los niveles menores de 16C en las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A.

5.4 LA SOBREEXPRESIÓN DE *SKP2A* INDUCE LA FORMACIÓN DE PRIMORDIOS DE RAÍCES LATERALES

Aunque en la actualidad todavía se desconocen muchos de los mecanismos y genes implicados en determinar que células del periciclo son las que deben formar raíces laterales a lo largo del desarrollo, sí se sabe que este proceso de formación de raíces laterales está determinado genéticamente. Así por ejemplo, el lugar de aparición del primer primordio con respecto al meristemo radicular guarda una distancia determinada, y lo mismo ocurre entre primordios (Malamy, 2005). Para analizar los efectos de la sobreexpresión de *SKP2A* sobre la formación de primordios de raíces laterales (PRL), se realizaron tinciones histoquímicas de la actividad GUS en líneas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE}, ya que el gen de la *CYCLINA B1* se induce durante las primeras divisiones de las células del periciclo. Usando este marcador de CYCB1-GUS se observó que la distancia del primer primordio con respecto al meristemo radicular se acortaba en las plantas que sobreexpresaban MYC-SKP2A (figura 17a). Por otro lado, también se encontró que el número de PRL formado por centímetro de raíz principal aumentaba en las plantas que sobreexpresaban MYC-SKP2A (figura 17b).

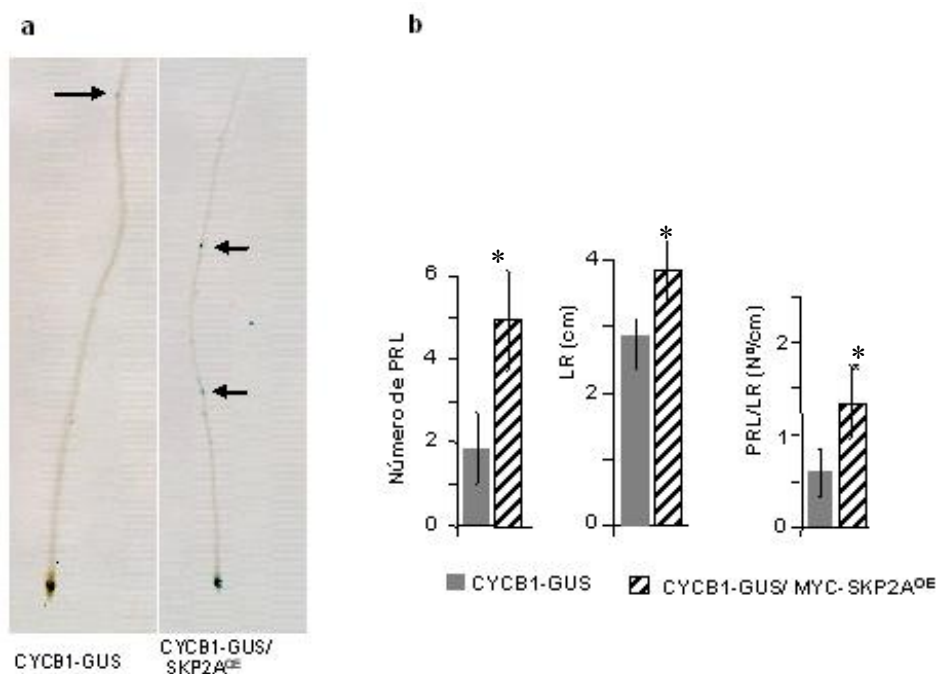


Figura 17. a: Tinción GUS de raíces de plantas de 5 días de líneas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE}. Las flechas señalan la localización de los primordios más jóvenes de las raíces laterales (LRP). **b:** Cuantificación del número de LRP por centímetro de raíz principal (LR). Los LRP se cuantificaron mediante tinciones GUS en plantas de 5 días CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE}. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Es bien conocido que la respuesta a auxinas controla la formación de los primordios de raíces laterales (Ruegger *et al.*, 1998). Por ello, se decidió analizar si el incremento de PRL por la sobreexpresión de MYC-SKP2A conllevaba una mayor respuesta a las auxinas. Para ello se cruzaron plantas MYC-SKP2A^{OE} con plantas que portaban el marcador de respuesta a auxina DR5::GUS. Mediante tinciones histoquímicas GUS se comprobó que en el cruce DR5::GUS/ MYC-SKP2A^{OE} tiene una mayor expresión del marcador. Asimismo, el primer punto de expresión de DR5::GUS estaba mas cercano al meristemo radicular (figura 18a), de forma similar a lo que ocurriría en la expresión CYCB1-GUS.

Para analizar el efecto de SKP2A sobre la formación de las raíces laterales respecto a la respuesta a auxina, se realizaron cruces de plantas MYC-SKP2A^{OE} con plantas mutantes *solitary root* y *axr1-12*. Estos mutantes se caracterizan por su baja capacidad de respuesta a auxina y por desarrollar un menor número de raíces laterales (*axr1-12*) o por su incapacidad total de desarrollarlas (*slr1*) (Fukaki *et al.*, 2002). Se cuantificó el número de primordios de raíces laterales en plantas *axr1-12* y *axr1-12*/MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio MS durante de 10 días. Como se observa en las figuras 18b y 18c, no se produjo un incremento en el número de PRL en las plantas *slr1*/MYC-SKP2A^{OE} ni *axr1-12*/SKP2A, sugiriendo que la función de SKP2A es dependiente de la respuesta a las auxinas para desarrollar más primordios de raíces laterales.

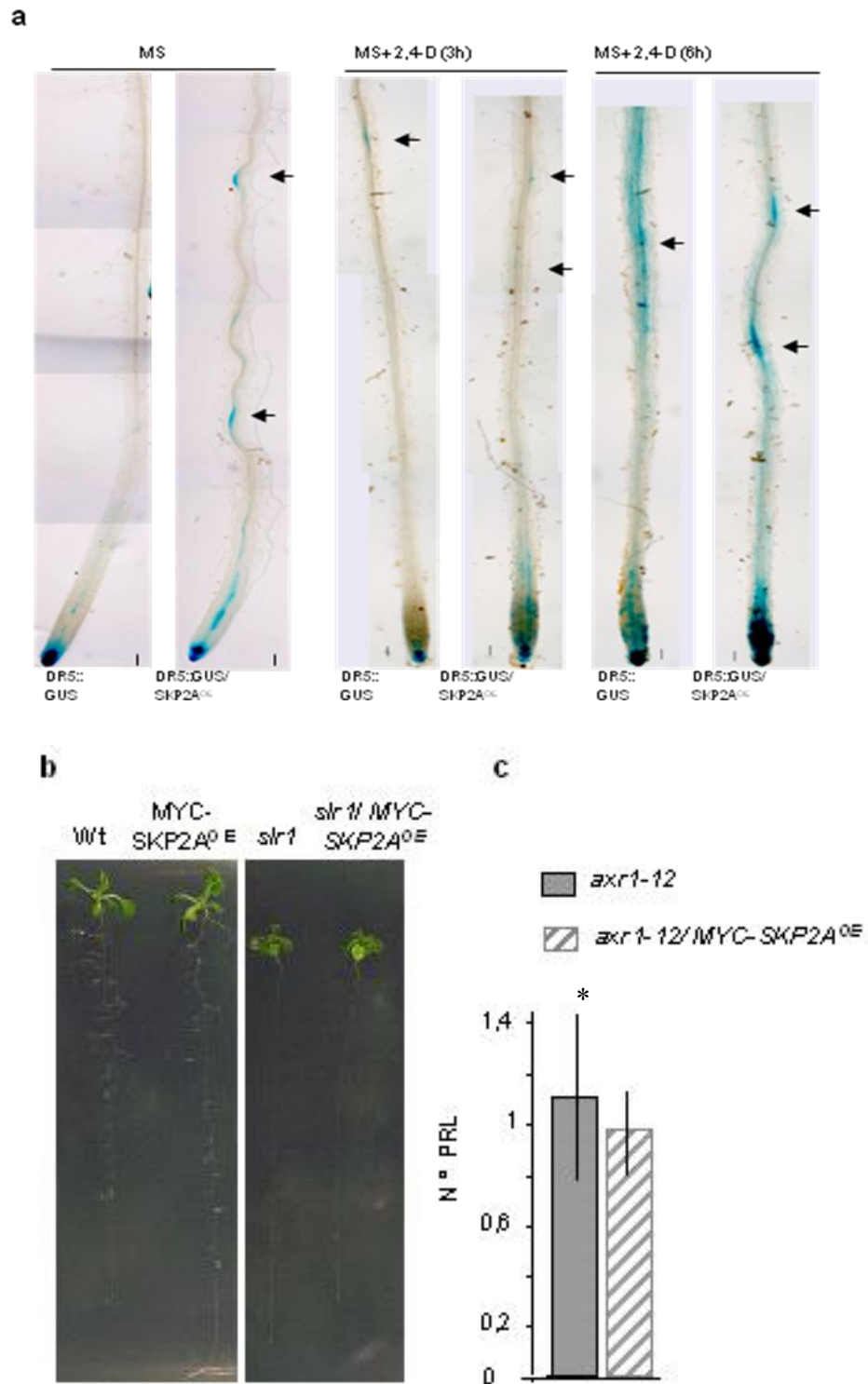


Figura 18. a: Tinción GUS de plantas DR5::GUS y DR5::GUS/ MYC-SKP2A^{OE}. Las flechas indican los puntos de respuesta a auxinas. **b:** Plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *slr1* y *slr1*/ MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio MS durante 10 días. **c:** Cuantificación del número de LRP por cm de raíz principal de plantas de 10 días *axr1-12* y *axr1-12*/MYC-SKP2A. Las barras corresponden a dos medidas independientes. El asterisco indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

5.5 RESPUESTA DE SKP2A EN CONDICIONES DE ESTRÉS

5.5.1 Crecimiento de la raíz principal de SKP2A en medio MS, NaCl y ABA

Las plantas son organismos sésiles que necesitan un sistema rápido y eficaz para poder adaptarse a las nuevas condiciones ambientales desfavorables y así, modificar y ajustar el desarrollo y el metabolismo en concordancia con tales cambios. Uno de los efectos apreciables que sufren las plantas frente a situaciones de estrés es que su tasa de crecimiento disminuye, debido en gran parte a una reducción en la división celular. Ya que la sobreexpresión de SKP2A aumenta la división celular, decidimos analizar el comportamiento de estas plantas sobreexpresoras frente a diferentes estreses. Para ello se analizó el crecimiento de las raíces de las plantas silvestres, del mutante (*skp2a*) y de las sobreexpresora de SKP2A (MYC-SKP2A^{OE}) en medio MS, MS + 100 mM de NaCl, y MS + ABA 5×10^{-6} M, y se midió la longitud de la raíz principal a los 5, 8 y 13 días.

Como podemos observar en la figura 19a, cuando las plantas crecieron en medio MS, el tamaño final de MYC-SKP2A^{OE} fue estadísticamente mayor que el alcanzado por las plantas silvestres y mutantes. Cuando estas plantas se sembraron en medio MS + NaCl 100 mM se observó también mayor tolerancia a la salinidad durante los primeros 8 días en plantas MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*, hasta alcanzar porcentajes de inhibición similares al de las plantas silvestres a 13 días (figura 19b). Las plantas crecidas en MS + ABA 5×10^{-6} M (figura 19b), presentaron un patrón de crecimiento muy diferente a las anteriores; las plantas más resistentes a esta condición de crecimiento fueron las silvestres, mientras que las plantas MYC-SKP2A^{OE} y las mutantes redujeron drásticamente su crecimiento en respuesta a ABA.

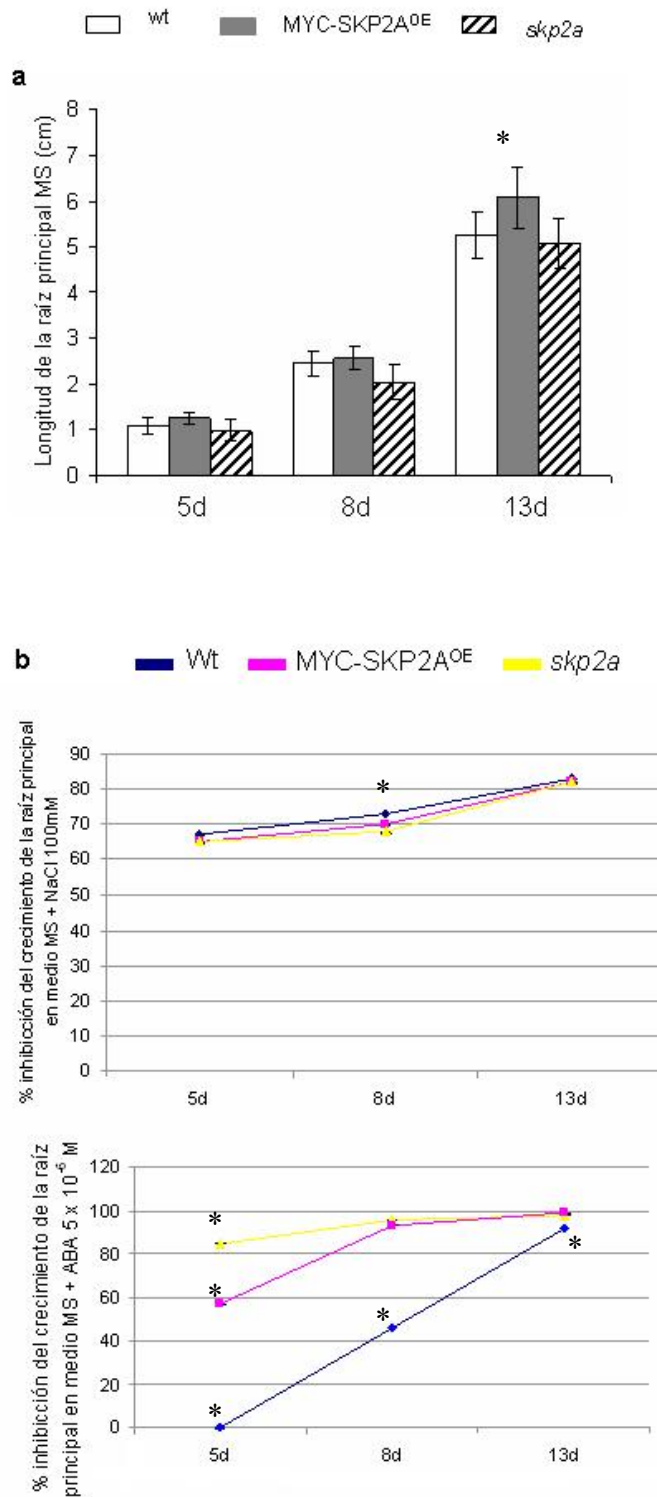


Figura 19. a: Medida de la longitud de la raíz principal de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skip2a* crecidas a 5, 8 y 13 días, sembradas en medio MS. **b:** Representación del porcentaje de inhibición del crecimiento de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skip2a* crecidas en medio MS + NaCl 100 mM o MS + ABA 5 x 10⁻⁶ M durante 5, 8 y 13 días. Se sembraron 50 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

5.5.2 Función de *SKP2A* en la respuesta a un exceso de sacarosa

El crecimiento de las plantas depende del balance entre la división celular de los meristemas y la posterior expansión de las células diferenciadas. Este crecimiento está regulado por un balance de respuesta a diferentes hormonas y a nutrientes, como la sacarosa. El descubrimiento del papel de los azúcares como reguladores en procesos de desarrollo y crecimiento, independientemente de su importancia como fuente de carbono, así como su interacción con las vías de señalización hormonal, han llevado a considerarlos como posibles fitohormonas (Rolland *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, altos niveles de sacarosa en el medio inhiben la expansión de los cotiledones, y afecta también a la formación de hojas y raíces (Gibson, 2005). Para analizar el efecto de la sacarosa en plantas que sobreexpresaban MYC-SKP2A o plantas *skp2a*, se crecieron plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* en medio MS con diferentes concentraciones de sacarosa (0%, 5%, 7% y 9%). Las plantas que sobreexpresaban *SKP2A* y el mutante *skp2a* mostraron una mayor supervivencia respecto a las plantas control silvestres en condiciones saturantes de sacarosa (figura 20).

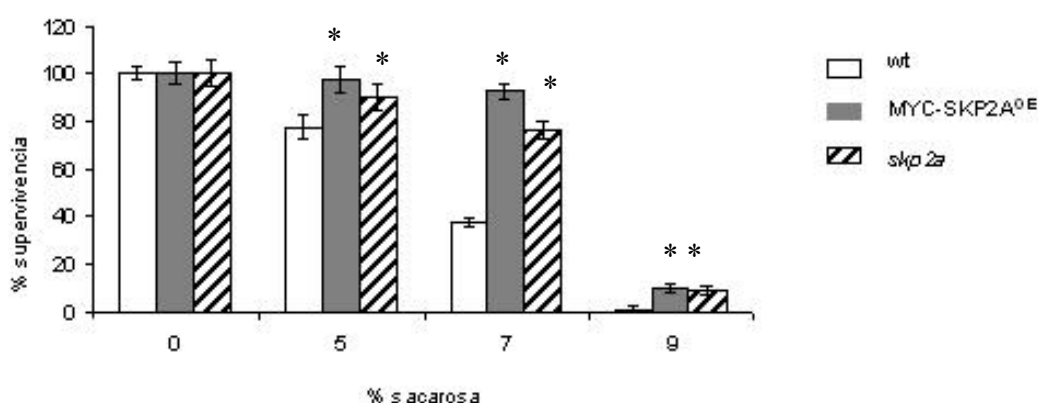


Figura 20. Medida de la supervivencia de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas durante 12 días en placas de medio MS con distintas concentraciones de sacarosa (0%, 5%, 7% y 9%). Se sembraron 50 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los análisis de expresión de bases de datos públicas (GENEVESTIGATOR) revelaron que *SKP2A* se inducía por estrés osmótico. Los efectos del exceso de sacarosa en las plantas, puede producir este efecto osmótico, pero también podría ser consecuencia del papel de la sacarosa como fuente de carbono (Do y Cormier, 1990). Para valorar el papel de los niveles de SKP2A en la respuesta a estrés osmótico, se llevó

a cabo un experimento en presencia de distintas concentraciones de manitol, lo que permitió estudiar los efectos derivados del estrés osmótico (Thompson *et al.*, 1986). Para realizar estos ensayos, se crecieron semillas de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*, en medio MS o medio MS suplementado con manitol (150 mM y 300 mM) durante 13 días. En la figura 21a se pueden observar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la capacidad de supervivencia de las plantas, ya que sólo un 44% de las plantas silvestres fue capaz de germinar, frente al 75% de las plantas *skp2a* y el 100% de las plantas MYC-SKP2A^{OE}.

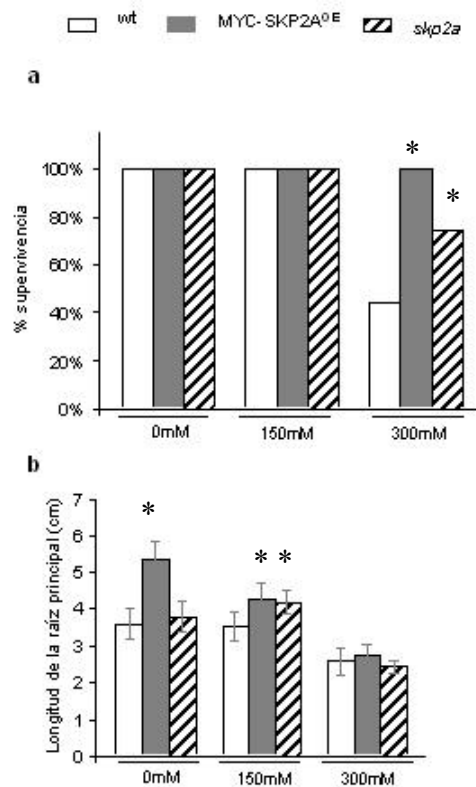


Figura 21. a: Medida de la supervivencia de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas durante 13 días en placas de medio MS con distintas concentraciones de manitol (0mM, 150mM y 300mM). Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. **b:** Longitud de la raíz principal en cm de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas en placas de medio MS con distintas concentraciones de manitol (0 mM, 150 mM y 300 mM), y que lograron sobrevivir al cabo de 13 días. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

Sin embargo, analizando las plantas germinadas, las diferencias en la longitud de la raíz principal entre los tres tipos de líneas se acortaron cuando se crecieron las plantas en presencia de manitol. En condiciones no saturantes de crecimiento en manitol (150 mM), las plantas mutantes y sobreexpresoras de MYC-SKP2A, presentaron una longitud de la raíz principal significativamente mayor que las plantas silvestres, lo cual se traduce también en una mayor tolerancia al estrés osmótico provocado por el manitol (figura 21b). Sin embargo, el crecimiento de la raíz principal en condiciones saturantes de manitol (300mM) alcanzó tamaños finales similares en los tres genotipos analizados (figura 21b).

5.5.3 Función de SKP2A en la respuesta a un exceso de temperatura

Dentro del grupo de factores ambientales que más limita el crecimiento de las plantas está la temperatura. Las plantas, como los demás seres vivos, están adaptadas a desarrollarse dentro de un determinado intervalo de temperatura. Las temperaturas que superan dicho rango pueden limitar el crecimiento y el desarrollo de las plantas, provocando daños que pueden llegar a ser letales. Cuando la temperatura se incrementa por encima del óptimo de crecimiento, los organismos vivos adoptan dos tipos de estrategias frente al estrés térmico: a) Intentar evitar que su temperatura interna alcance niveles excesivos y b) Contrarrestan los efectos nocivos, tolerando, al menos parcialmente, el exceso de temperatura. La principal respuesta a este estrés es la disminución de la síntesis de la mayor parte de proteínas y ARNm, así como el incremento de la síntesis de un determinado grupo de proteínas denominadas *proteínas de choque térmico* (*HSP*, *heat shock proteins*), implicadas en la defensa frente a las altas temperaturas (Haslbeck *et al.*, 1999). Al analizar los niveles de expresión de SKP2A en distintos microordenamientos de ADN (GENEVESTIGATOR), se detectó que la expresión de este gen se inducía por altas temperaturas. Con el fin de analizar los efectos del exceso de temperatura en las líneas mutantes y sobreexpresoras de SKP2A, se crecieron semillas de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*, durante 13 días a 22°C en medio MS (plantas control), 5 días en medio MS a 22°C + 1h a 42°C en oscuridad + 8 días a 22°C en luz, o 5 días en medio MS a 22°C + 30 minutos a 52°C en oscuridad + 8 días a 22°C en luz. Posteriormente se analizó el crecimiento de la raíz. Las plantas MYC-SKP2A^{OE}, pero en mayor medida las plantas *skp2a*, fueron

significativamente más resistentes a las altas temperaturas que las plantas silvestres (figura 22).

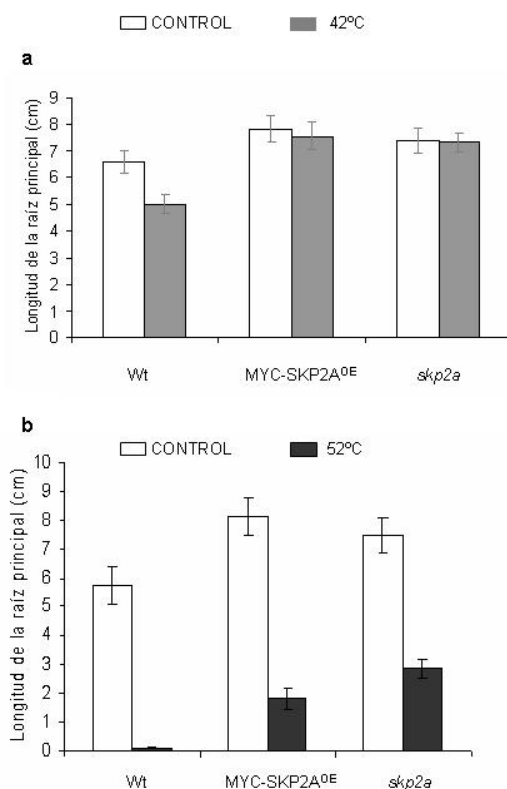


Figura 22. a: Medida de la longitud de la raíz principal en centímetros (cm) de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas durante 13 días (d) en medio MS a 22°C, o 5d en placas de medio MS a 22°C + 1h a 42°C en oscuridad + 8d a 22°C. **b:** Medida de la longitud de la raíz principal en cm, de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas durante 13d en medio MS a 22°C, o 5d en placas de medio MS a 22°C + 30min a 52°C en oscuridad + 8d a 22°C. Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas.

5.5.4 SKP2A mantiene la división celular en condiciones de ausencia de fosfato

El fósforo es un macronutriente esencial para todos los organismos. En plantas la ausencia de fosfato (Pi) reduce los niveles de la biomasa y cambia el balance de crecimiento entre la parte aérea y la raíz, ya que reduce el crecimiento aéreo e incrementa el desarrollo radicular (Ticconi *et al.*, 2001). Asimismo, el déficit de Pi atenúa el crecimiento de la raíz principal, pero favorece el crecimiento de las raíces laterales (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). En cultivos celulares la ausencia de fosfato bloquea la división celular (Okamura *et al.*, 1973), sugiriendo que la disponibilidad de este nutriente puede controlar la tasa de proliferación celular. Estudios recientes utilizando el marcador CYCB1-GUS han revelado que el déficit de Pi disminuye la actividad mitótica en los meristemos radiculares (Ticconi *et al.*, 2004, Sánchez-

Calderón *et al.*, 2005). Debido a que la sobreexpresión de SKP2A aumentaba los niveles de CYCB1;1 y afectaba también al crecimiento de las raíces laterales, se decidió analizar si los niveles de Pi podían regular la expresión y la función de SKP2A. Para ello, se crecieron plantas SKP2A::GUS en presencia o ausencia de fosfato y posteriormente se llevaron a cabo análisis histoquímicos para observar la actividad GUS. Las plantas crecidas en ausencia de Pi mostraron una importante reducción de actividad GUS en la parte aérea de la planta (figura 23a), mientras que la expresión de SKP2A se incrementó en el tejido vascular de la raíz (figura 23b). Parece, por tanto, que los niveles de fosfato en el medio pueden regular la expresión de SKP2A.

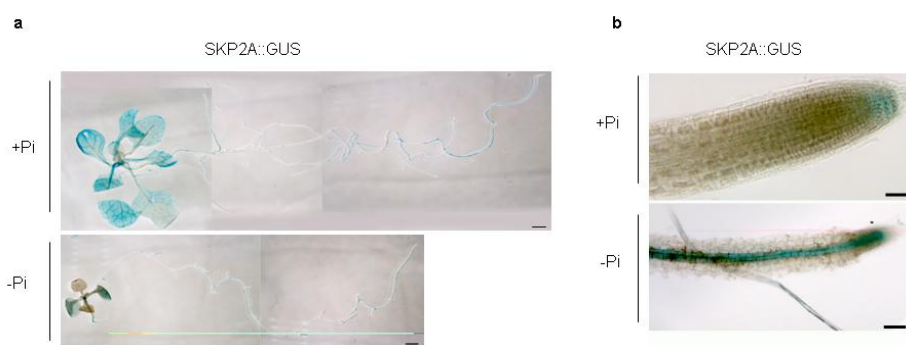


Figura 23. a: Tinciones GUS de plántulas SKP2A::GUS crecidas durante 5 días en medio completo (+Pi) y 9 días más en presencia o ausencia de fosfato (-Pi). Barra = 0,5 cm. b: Detalle de los meristemos radiculares de las plantas mostradas en a. Barra = 0,25 mm.

Como siguiente paso se quiso analizar los efectos de la sobreexpresión de MYC-SKP2A en las células de los meristemos en ausencia de Pi. Para ello, se crecieron plantas de líneas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} durante 4 días en medio MS completo, y 7 ó 14 días más en medio con y sin fosfato. A los 7 días de crecimiento sin fosfato, la actividad GUS se redujo significativamente en los meristemos radiculares de plantas CYCB1-GUS crecidas en ausencia de Pi, pero no en las líneas CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} (figura 24a). En las plantas CYCB1-GUS o CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 14 días sin Pi en el medio no se encontró actividad GUS ni en meristemos radiculares ni apicales (figura 24b). Sin embargo, aproximadamente un 25% de los primordios de raíces laterales de las plantas CYCB1/MYC-SKP2A^{OE} expresaban GUS, pero no los primordios de plantas CYCB1-GUS (figura 24b). A continuación, se analizó el efecto de la ausencia de fosfato sobre el mutante *skp2a* (Ren *et al.*, 2008), para lo que se realizaron construcciones

skp2a/CYCB1-GUS. Estas plantas y los controles se crecieron durante 4 días en medio completo, y 10 días más en medio con/sin fosfato. Como se observa en la figura 24c, la expresión de CYCB1-GUS se redujo notablemente en el mutante, lo que sugeriría que la tasa de división celular estaba disminuida. Este resultado indica que *SKP2A* puede regular la división celular en respuesta a un estrés por deficiencia de fosfato.

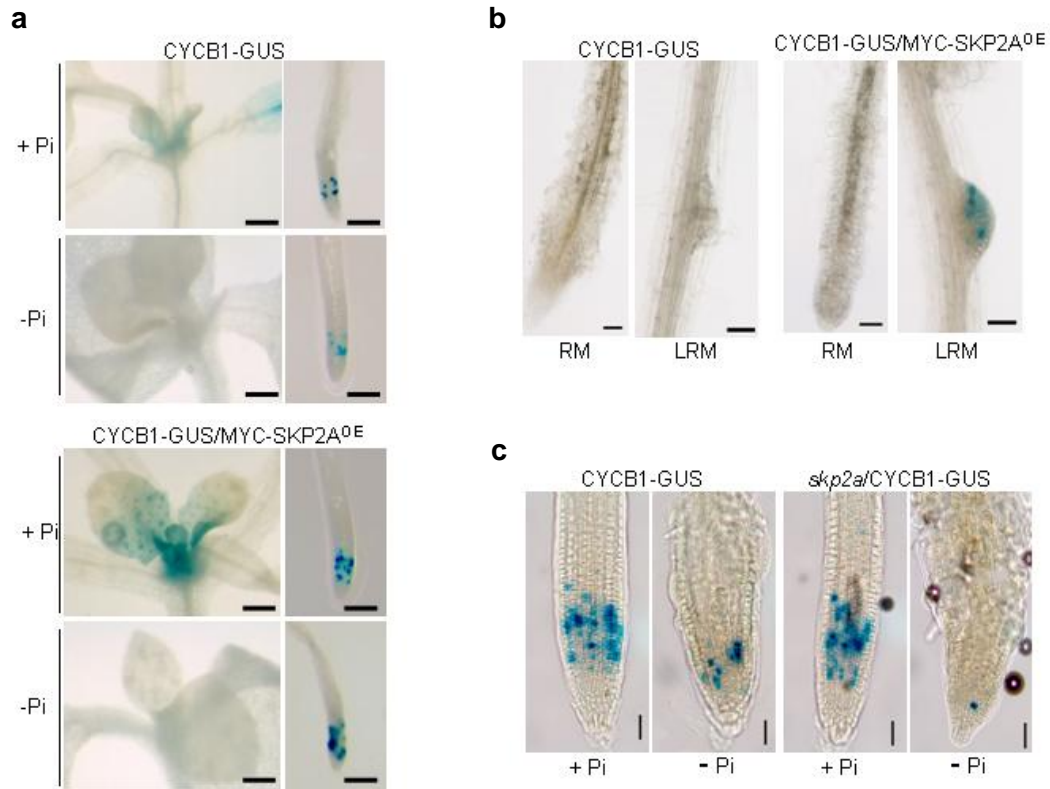
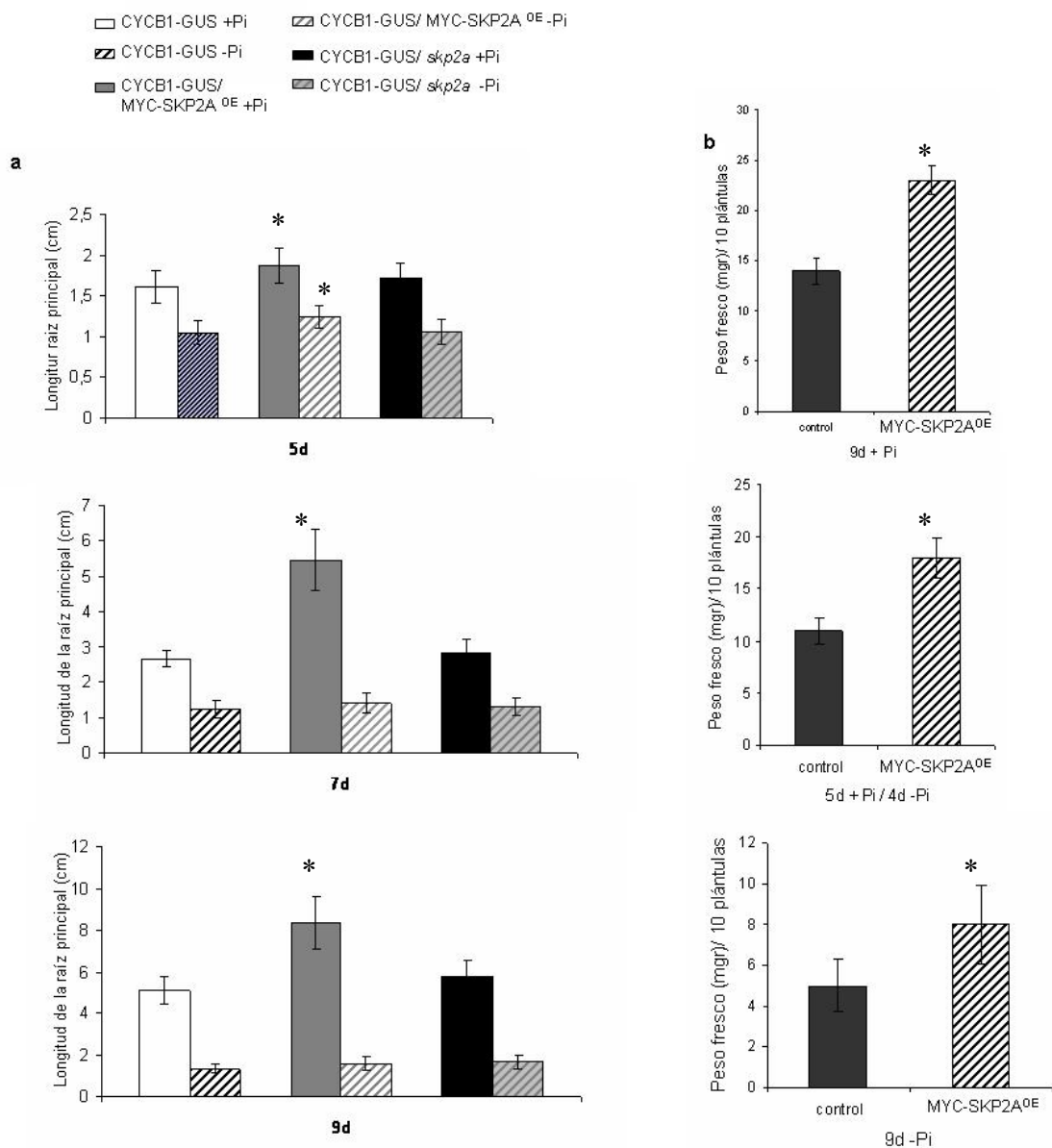


Figura 24. **a:** Tinciones GUS de plantas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio completo durante 4 días y transferidas a medio con fosfato (+Pi) o sin fosfato (-Pi) durante 7 días. Barra = 0,25 mm. **b:** Tinción GUS de los meristemos de la raíz principal (RM) y meristemos de raíces laterales (LRM) de plantas CYCB1-GUS y CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio completo durante 4 días y transferidas a medio sin fosfato (-Pi) durante 14 días. Barra = 0,25 mm. **c:** Tinción GUS de líneas CYCB1-GUS y *skp2a*/CYCB1-GUS crecidas en medio completo durante 4 días y transferidas a medio con fosfato (+Pi) o sin fosfato (-Pi) durante 10 días. Barra = 0,25 mm.

Para analizar cómo afectaba la presencia/ausencia de Pi en el crecimiento radicular, se realizó un estudio de la longitud de la raíz principal sobre plantas CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*/CYCB1-GUS crecidas a 5, 7 y 9 días. En la figura 25a se observa como en condiciones de ausencia de Pi, la raíz principal detuvo su crecimiento a lo largo del tiempo tanto en plantas silvestres, como en MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*. Por último, se analizaron los efectos de la ausencia de Pi en la producción de biomasa. Como se observa en la figura 25b las plantas MYC-SKP2A^{OE}, tanto en condiciones de presencia como de ausencia de Pi, produjeron mayor cantidad

de biomasa que las plantas silvestres. Una posible explicación del mejor crecimiento de las plantas que sobreexpresan MYC-SKP2A en ausencia de Pi, es que éstas acumulan mayor cantidad de este nutriente cuando crecen en medios completos. Para analizar esta posibilidad, se cuantificó el Pi acumulado en plantas CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*/CYCB1-GUS crecidas en condiciones de ausencia o presencia de fosfato. Las plantas CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} presentaron valores significativamente menores que las plantas control o las plantas mutantes, acumulando menores cantidades de Pi (figura 25c).



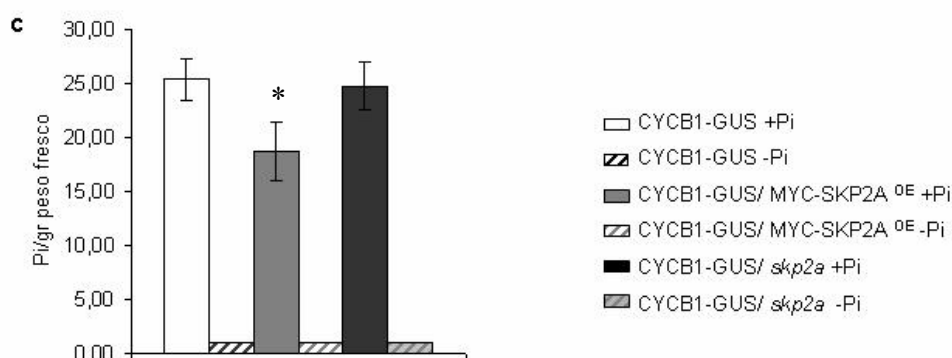


Figura 25. a: Medidas de la longitud de la raíz principal (cm) de 30 plantas CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*/CYCB1-GUS a 5, 7 y 9 días en placas de medio MS \pm Pi. **b:** Peso fresco de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio completo durante 9 días, 5 días en medio completo más 4 días con o sin Pi, y 9 días en ausencia de fosfato. **c:** Medida del contenido de Pi por gr de peso fresco en plantas CYCB1-GUS, CYCB1-GUS/MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*/CYCB1-GUS. Las plantas se vernalizaron durante 3 días y se crecieron 4 días en placas con medio completo, tras ello se pasaron a placas nuevas de +Pi o -Pi, según correspondiera. Para disminuir el error de la medida del peso fresco, se agruparon las plantas en grupos de 5 individuos. El contenido de Pi se midió por colorimetría. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

5.6 LA PROTEÍNA SKP2A EN LA RUTA DE DEGRADACIÓN UBIQUITINA/PROTEASOMA 26S

5.6.1 SKP2A forma parte de un complejo SCF ubiquitina ligasa activo

Los complejos SCF están formados por cuatro subunidades: CUL1, ASK, RBX y proteínas de tipo *F-box*. En Arabidopsis, se han identificado más de 700 proteínas *F-box*, sin embargo no se ha demostrado que todas formen complejos SCF, y hasta la fecha no se había mostrado la actividad E3 ubiquitina ligasa de estos complejos en plantas. Estudios previos han revelado que SKP2A co-inmunoprecipitaba con CUL1, sugiriendo que esta *F-box* puede formar parte de un complejo SCF *in vivo* (del Pozo *et al.*, 2002). En este trabajo mostramos que MYC-SKP2A y ASK1 co-inmunoprecipitan *in vivo* (figura 26a), lo que apoya la idea de que SKP2A estaría formando parte de un complejo SCF *in vivo*. En Arabidopsis, la familia ASK está compuesta por 21 miembros. Para analizar la interacción de SKP2 con miembros de diferentes subgrupos de esta familia se usó la técnica de doble híbrido. Así, se analizaron las interacciones de SKP2A con ASK1, ASK2, ASK6, ASK8, ASK10, ASK14 y ASK18. Los resultados de este ensayo mostraron que SKP2A interaccionaba preferentemente con ASK1 y ASK2 y, en menor medida, con ASK18 (figura 26b). No se detectó interacción con el resto de los ASK analizados. Sin embargo, debido a las posibles limitaciones de la técnica, en

estos casos negativos, no se puede descartar que *in vivo* si pudieran interaccionar con otras proteínas ASK.

Por otro lado, para comprobar que este complejo SCF^{MYC-SKP2A} es activo, es decir que tiene actividad E3 ligasa de ubiquitina, se realizaron experimentos de ubiquitinación. Para ello, se mezclaron enzimas E1, E2 (UBC8 o UBC13, basándonos en datos de Bachmair *et al.*, 2001), y complejos SCF^{MYC-SKP2A} obtenidos mediante inmunopurificación. Como primera aproximación, se comprobó que las enzimas UBC8 y UBC13 expresadas en bacterias tenían actividad conjugadora de ubiquitina mediante una reacción de ubiquitinación sin agente reductor, por lo que se detectó el enlace tiolester entre las enzimas E1 o E2 y la ubiquitina (figura 26c). Una vez que comprobamos la actividad E1/E2, se decidió analizar si el complejo SCF^{MYC-SKP2A} poseía actividad ubiquitina ligasa. Para ello, se mezclaron las enzimas E1, E2, y la ubiquitina biotinilada con el complejo SCF^{MYC-SKP2A}. Como se muestra en la figura 26d, en presencia de enzimas E1 y E2, el complejo SCF^{MYC-SKP2A} presentaba actividad ligasa de ubiquitina. Asimismo, en estos análisis se observó que el complejo SCF^{MYC-SKP2A} era más activo cuando se incubaba con la enzima UBC8 que en presencia de UBC13, sugiriendo que UBC8 puede ser una de las enzimas E2 que interactúa con el complejo E3 formado por SKP2A. Es interesante remarcar que en las reacciones en las que se omite la E2 (carriles 5 y 9) también se observó ubiquitinación, sugiriendo que MYC-SKP2A puede co-inmunoprecipitar con una E2 *in vivo*. Como control de las reacciones se llevó a cabo el ensayo de ubiquitinación en ausencia de ATP, no observándose señal de ubiquitinación (figura 26e).

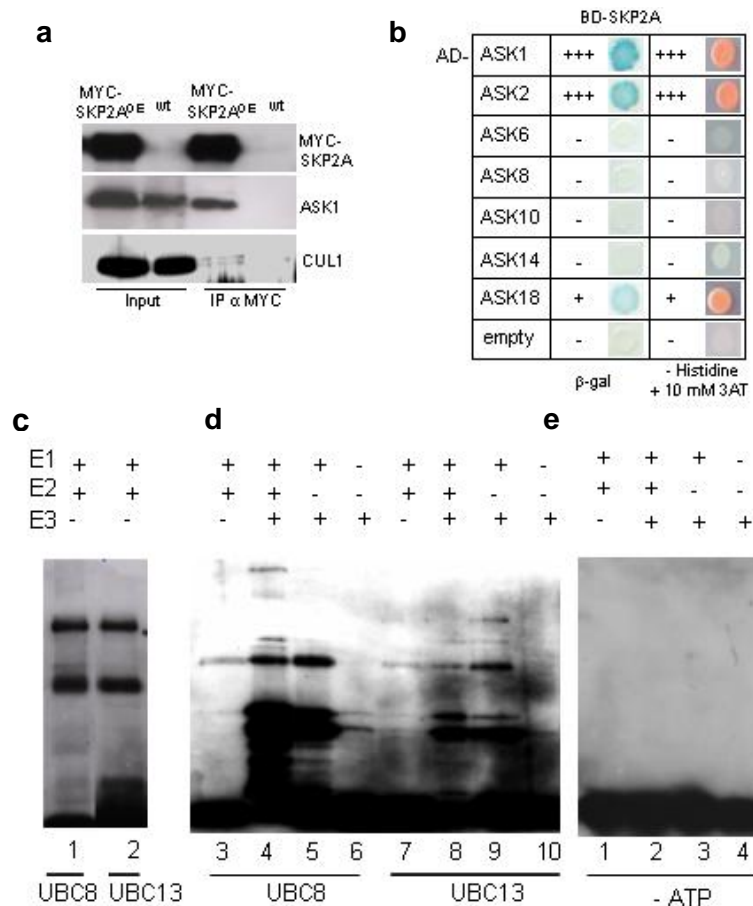


Figura 26. a: Immunoprecipitación de proteína MYC-SKP2A. Immunodetección de las proteínas CUL1 y ASK1 que co-immunoprecipitan con SKP2A. **b:** Ensayos de interacción mediante el sistema de dos híbridos entre SKP2A y diferentes miembros de la familia ASK. **c:** Comprobación de la actividad conjugadora de Ub de las E2 UBC8 y UBC13. En este caso las muestras no se hierven ni llevan DTT para preservar los enlaces tiolester. El asterisco indica E1 y la flecha marca la presencia de E2 unida a Ub por un enlace tiolester. **d:** Ensayo de ubiquitinación *in vitro* usando dos tipos distintos de enzimas E2 (UBC8 y UBC13) y la enzima E3 (SCF^{MYC-SKP2A} inmunopurificada). **e:** Ensayo control de ubiquitinación *in vitro*, igual que en **d**, pero en ausencia de ATP.

5.6.2 SKP2A se degrada a través de la ruta ubiquitina/proteasoma 26S

La actividad de las proteínas *F-box* se regula por diferentes mecanismos, entre los que se han descrito la degradación selectiva por ubiquitinación (Galan y Peter, 1999). Para comprobar si la proteína MYC-SKP2A se regulaba por ubiquitinación y degradación por el proteasoma, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación y western-blot de extractos de plántulas MYC-SKP2A^{OE} y de un control silvestre, así como ensayos de degradación *in vivo* e *in vitro*. Al analizar los inmunoprecipitados, se detectaron distintas isoformas de MYC-SKP2A, lo que sugiere la posible modificación post-traducciona de esta proteína (figura 27a). Una posibilidad es que MYC-SKP2A estuviera modificada con Ub, por ello, la misma membrana se incubó posteriormente con un anticuerpo contra ubiquitina, detectándose señal en la misma banda que

correspondía a MYC-SKP2A y en un rastro de alto peso molecular (figura 27b). Esto indica que MYC-SKP2A se ubiquitina *in vivo*, aunque no se puede descartar que parte del rastro de la señal del anticuerpo contra ubiquitina se deba a proteínas que co-inmunoprecipitan con MYC-SKP2A.

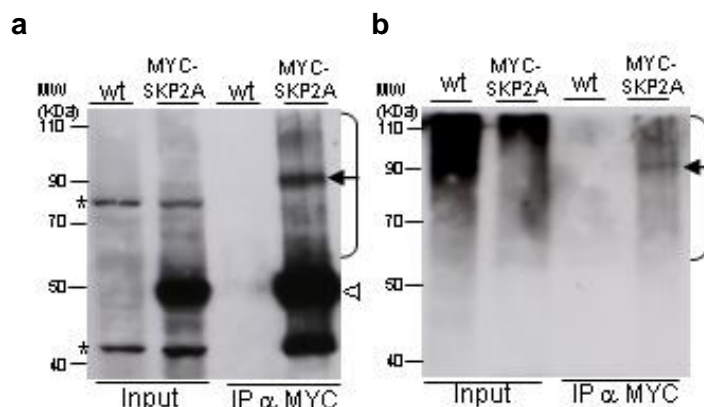


Figura 27. a: Extractos de proteínas de plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} se inmunoprecipitan y se detectan por western-blot usando anti-MYC. La cabeza de flecha en blanco indica la proteína MYC-SKP2A, el paréntesis indica un rastro de reacción cruzada con anticuerpo anti-MYC con anti-ubiquitina. Los asteriscos indican bandas inespecíficas. **b:** Western-blot de extractos de proteínas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} incubando con anti-ubiquitina IgGs contra ubiquitina. La flecha negra indica una banda que se detecta con ambos anticuerpos.

Ya que SKP2A parecía estar ubiquitinada, se analizó el efecto que el inhibidor del proteasoma 26S, MG132, tenía sobre la estabilidad de la proteína MYC-SKP2A. Para ello, plántulas MYC-SKP2A^{OE} de 5 días se incubaron en presencia de MG132 o de DMSO (solvente control). Como se observa en la figura 28a, MYC-SKP2A se acumuló por el efecto del inhibidor. Asimismo, los ensayos de degradación *in vitro* usando extractos de proteínas de plantas MYC-SKP2A^{OE} demostraron que la proteína MYC-SKP2A se degradaba a través del sistema UPS, ya que el inhibidor MG132 bloqueaba su degradación (figura 28b).

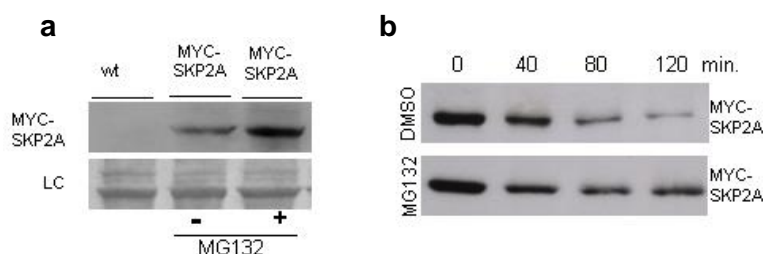


Figura 28. a: SKP2A se degrada por el complejo ubiquitina/proteasoma 26S. La incubación de plantas con inhibidor del proteasoma MG132 provoca la acumulación de la proteína MYC-SKP2A. **b:** Ensayo de degradación *in vitro* usando extractos de proteína MYC-SKP2A^{OE} a diferentes tiempos en presencia/ausencia de inhibidores del proteasoma. La degradación de la proteína MYC-SKP2A se retrasa en presencia del inhibidor.

5.6.3 SKP2A se modifica con ácido N-mirístico

Realizando un estudio *in silico* sobre la secuencia proteica de SKP2A, encontramos varios motivos susceptibles para la modificación con ácido N-mirístico. El ácido N-mirístico es un ácido graso saturado compuesto por una cadena de 14 carbonos unida al grupo amino de la glicina N-t ($C_{14}H_{28}O_2$). Los procesos de miristilación de proteínas son irreversibles y, en general, tienen lugar de forma co-traducciona por la N-miristil transferasa (NMT), enzima encargada de formar el enlace amida entre el ácido mirístico y el grupo N-t de la glicina, utilizando como sustrato la miristil-coenzima A (Rudnick *et al.*, 1990; Rudnick *et al.*, 1993). La modificación con este ácido está comúnmente asociada a la interacción con la membrana plasmática o a la interacción proteína-proteína (Murray *et al.*, 1993). Para comprobar si SKP2A se modificaba con ácido mirístico, se realizaron un experimento de traducción *in vitro* de la proteína SKP2A y de la proteína GFP, como control, en presencia de [35 S]-metionina para analizar la eficiencia de la traducción, o en presencia de metionina fría más ácido N-mirístico marcado con tritio (ácido [9, 10(n)- 3 H]-mirístico). Como se muestra en la figura 29, SKP2A, pero no GFP, se modificó con ácido N-mirístico, por lo que podemos concluir que la proteína SKP2A sufre un proceso de modificación con ácido N-mirístico.

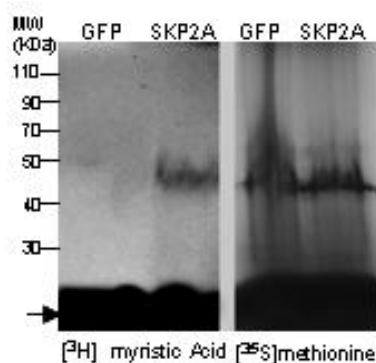


Figura 29. Traducción de proteínas GFP y SKP2A *in vitro* en presencia de [35 S]-metionina o ácido [9, 10(n)- 3 H]-mirístico. La flecha indica el ácido o la metionina que ha quedado libre tras la traducción.

5.7 ESTUDIO DE SKP2A EN LA RESPUESTA A AUXINA

5.7.1 La auxina afecta al crecimiento y al desarrollo de la raíz de plantas que sobreexpresan MYC-SKP2A

Como se vió en otros apartados, la sobreexpresión de SKP2A aumenta la división celular, y ya que la proteína SKP2A parece tener una relación con la auxina, se decidió analizar cómo afectaba la presencia de auxina en el medio al desarrollo radicular de las plantas MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a*. Para ello se analizó el crecimiento de las raíces de las líneas silvestre, *skp2a* y MYC-SKP2A^{OE} en medio MS y MS + 2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M, y se midió la longitud de la raíz principal a los 5, 8 y 13 días. Como se observa observar en la figura 30a, el tamaño final de las raíces de plántulas MYC-SKP2A^{OE} fue significativamente mayor que el alcanzado por las plantas silvestres y *skp2a*. Sin embargo, el crecimiento de la raíz de las plantas MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* fue significativamente más tolerante a la presencia de bajas concentraciones de auxina en el medio que el de las plantas silvestres (2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M) (figura 30b).

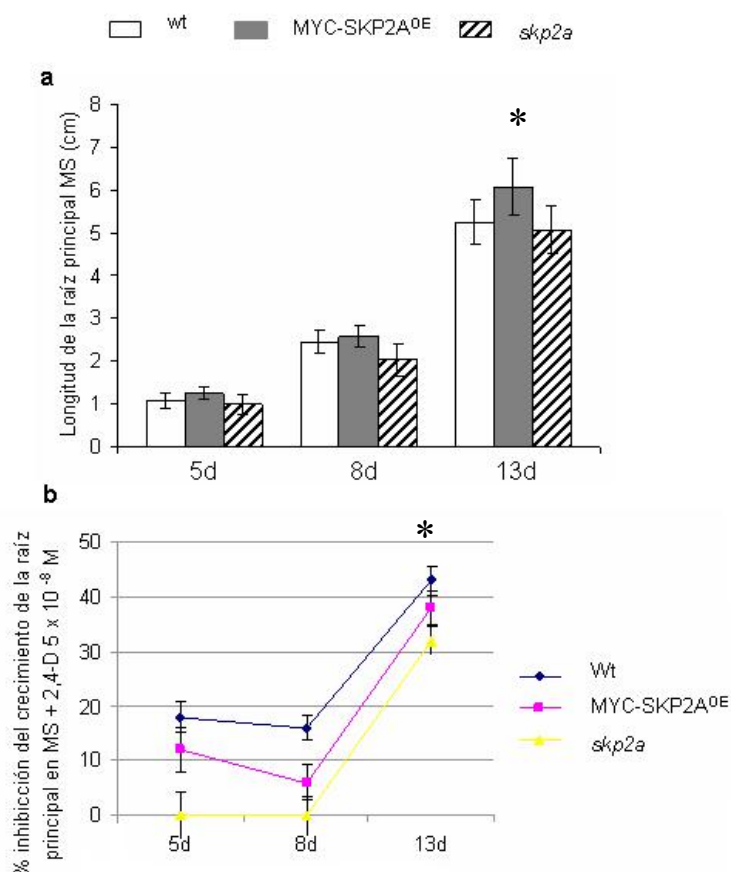


Figura 30. a. Crecimiento de la raíz principal en centímetros (cm) de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas a 5, 8 y 13 días, en medio MS o MS + 2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M. Se sembraron 50 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. **b:** Representación del porcentaje de inhibición del crecimiento de plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* crecidas en medio MS + 2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M durante 5, 8 y 13 días. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para estudiar en más detalle la relación entre la proteína SKP2A y la auxina en el desarrollo radicular, se analizó el efecto de la sobreexpresión de MYC-SKP2A en los mutantes *aux1-7* y *tir1-1*. El gen AUX1 es un transportador de influjo auxínico, que codifica para una proteína de membrana similar a una permeasa, que funciona como un transportador de protones (Bennett *et al.*, 1996). El mutante *aux1-7* se caracteriza por poseer resistencia a auxinas y etileno, presentar alteraciones en el gravitropismo radicular, un menor número de raíces laterales y un patrón de distribución anormal de las mismas (Pickett *et al.*, 1990). Para estudiar si la sobreexpresión de SKP2A tenía algún efecto sobre el gravitropismo, se crecieron plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *aux1-7*, *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-1 y *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-2 durante 6 días en medio MS o 5 días en medio MS + 1 día en medio MS con auxinas (2,4-D 5x10⁻⁸M), y se midió el ángulo de gravitropismo de las distintas líneas. En la figura 31a se muestran los resultados del gravitropismo de las raíces. Las plantas silvestres y MYC-SKP2A^{OE} crecidas en medio MS fueron completamente gravitrópicas, mientras que las *aux1-7* mostraron un marcado agravitropismo. Si bien las líneas *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-1 y *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-2 fueron agravitropicas, pero cuando se compararon con el mutante *aux1-7* presentaban una disminución significativa del ángulo de gravitropismo, y en general un número significativo de plantas con ángulos de crecimiento cero (gravitrópicas). De igual forma, como se muestra en la figura 31b, las plantas *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-1 y *aux1-7*/MYC-SKP2A^{OE}-2 crecidas en medio con auxina presentaron una mayor respuesta gravitrópica que el mutante *aux1-7*. Así, la presencia de auxina en el medio y la sobreexpresión de MYC-SKP2A parecían estar favoreciendo que el crecimiento radicular se produjera en el sentido de la gravedad.

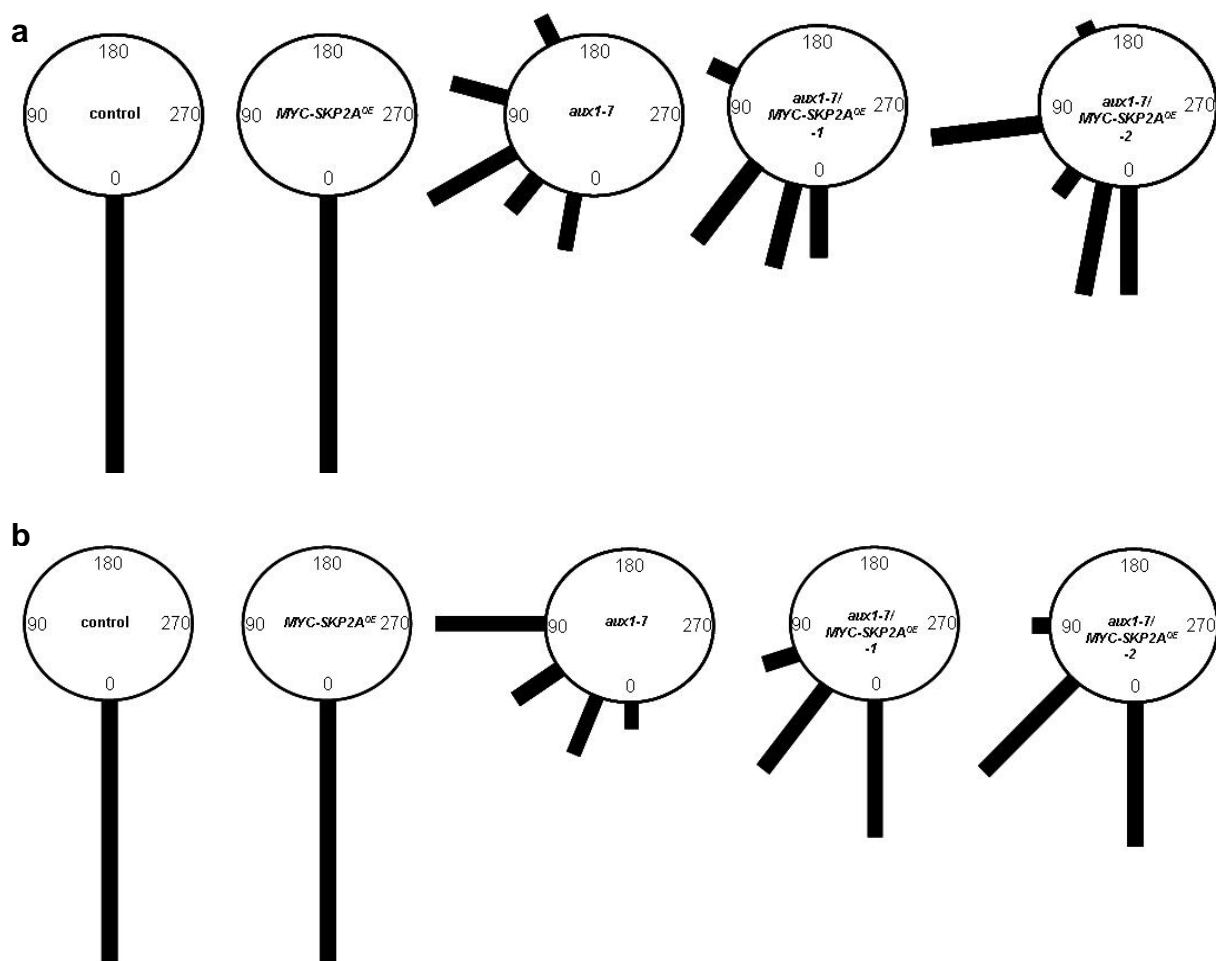


Figura 31. Porcentaje medio del ángulo de crecimiento agravitrópico de la raíz principal en plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *aux1-7*, *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-1* y *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-2* crecidas durante 6 días en medio MS (a) o 5 días MS + 1 día 2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M (b). Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. Los ángulos de crecimiento han sido agrupados de 30 en 30 grados a partir del ángulo 0 que se toma como único.

Como la sobreexpresión de MYC-SKP2A^{OE} en el fondo mutante *aux1-7* mostró variaciones en el crecimiento radicular, se realizaron estudios de la arquitectura radicular de estas líneas. Para ello, se midió el número de PRL de plantas de los fondos genéticos descritos anteriormente crecidas durante 6 días en medio MS o 5 días en medio MS + 1 día en medio MS con 2,4-D 5×10^{-8} M. Asimismo, también se cuantificó el número de raíces laterales desarrolladas a los 12 días de crecimiento en medio MS. La cuantificación del número de primordios/ por cm de la longitud de la raíz principal reveló que las líneas que sobreexpresaban la proteína MYC-SKP2A (*aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-1* y *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-2*) tenían un mayor número de PRL, tanto en plantas crecidas en MS como en medio con auxinas, que el mutante *aux1-7* (figura 32a).

Sin embargo, sólo en el caso de las plantas MYC-SKP2A^{OE} este incremento de PRL dio lugar a un aumento en el número de raíces laterales emergidas al cabo de 12 días de crecimiento en medio MS (figura 32b).

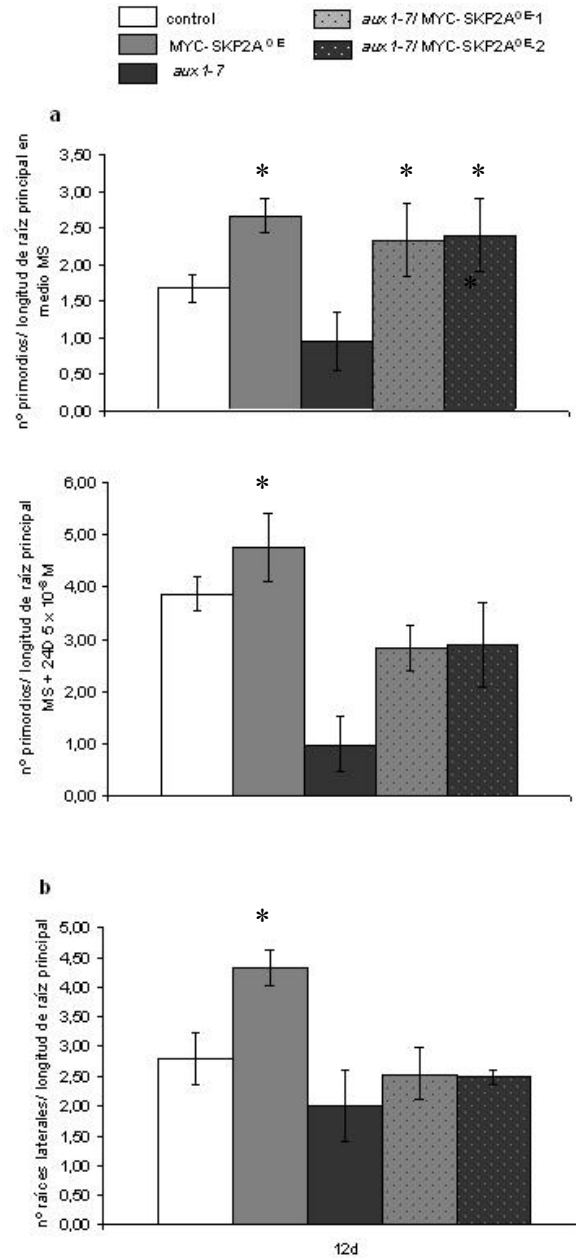


Figura 32. a: Representación del nº PRL/ longitud de la raíz principal (cm), en plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *aux1-7*, *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-1* y *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-2* crecidas durante 6 días (d) en medio MS o 5d MS + 1d 2,4-D 5×10^{-8} M. Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. **b:** Representación del nº RL/ longitud de la raíz principal (cm), en plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *aux1-7*, *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-1* y *aux1-7/ MYC-SKP2A^{OE}-2* crecidas durante 12 días en medio MS. Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. El asterisco indica que existen diferencias estadísticamente significativas. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para poder comprender mejor cómo la sobreexpresión de la proteína MYC-SKP2A daba lugar a un mayor número de PRL y qué papel estaba jugando la auxina en relación a *SKP2A*, se llevaron a cabo cruces entre plantas MYC-SKP2A^{OE} y plantas mutantes del receptor de auxinas TIR1. El mutante *tir1-1* tiene afectada la respuesta a la auxina, y presenta alteraciones en la proliferación y en la elongación celular, que fenotípicamente se traducen en deficiencias en el crecimiento del hipocotilo a altas temperaturas y en el desarrollo de las raíces laterales (Gray *et al.*, 1999). Para cuantificar el número de PRL, se crecieron plántulas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *tir1-1*, *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-1 y *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-6 durante 6 días en medio MS o 5 días en medio MS + 1 día en medio MS con 2,4-D 5×10^{-8} M.

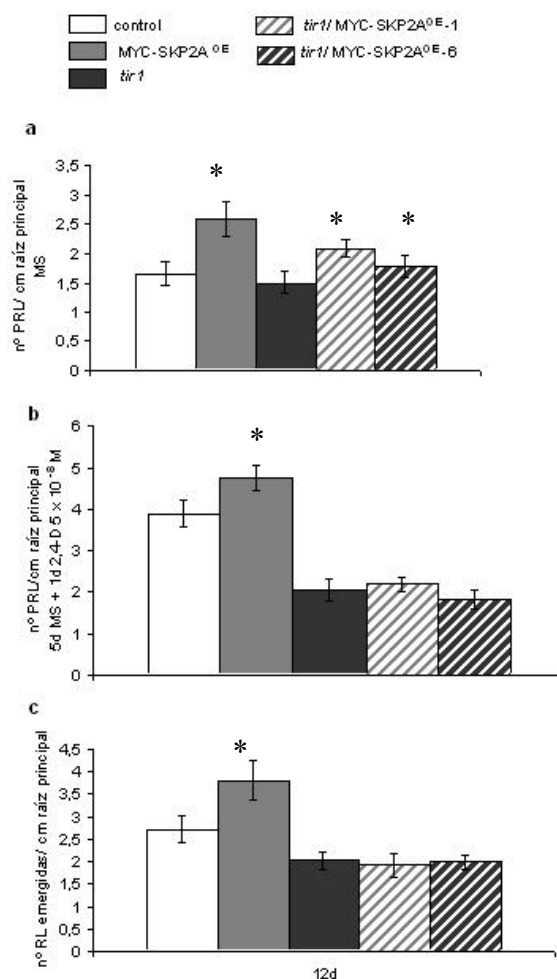


Figura 33. a: Representación del n° PRL/ longitud de la raíz principal (cm), en plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *tir1-1*, *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-1 y *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-6 crecidas durante 6 días (d) en medio MS o 5d MS + 1d 2,4-D $2,5 \times 10^{-8}$ M. Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa, en 3 réplicas. **b:** Representación del n° RL/ longitud de la raíz principal (cm), en plantas silvestres, MYC-SKP2A^{OE}, *tir1-1*, *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-1 y *tir1-1/* MYC-SKP2A^{OE}-6 crecidas durante 12d en medio MS. Se sembraron 30 individuos de cada tipo por placa y se realizaron 3 réplicas independientes. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la figura 33a, se muestra como las plantas MYC-SKP2A^{OE} presentaron un número significativamente mayor de PRL comparado con el mutante *tir1-1* y las plantas silvestres. Este valor también se incrementó de forma estadísticamente significativa en las plántulas *tir1-1*/MYC-SKP2A^{OE}-1 y *tir1-1*/MYC-SKP2A^{OE}-6 crecidas en medio MS, pero no cuando estas crecieron durante 1 día en presencia de 2,4-D. Tampoco el número de raíces laterales emergidas a los 12 días de crecimiento en medio MS sufrió ningún incremento significativo en estas líneas *tir1-1*/MYC-SKP2A^{OE}-1 y *tir1-1*/MYC-SKP2A^{OE}-6 en comparación con las plantas mutantes de *tir1-1* (figura 33b). Estos resultados con mutantes de transporte y respuesta a auxinas indican que *SKP2A* promueve la formación de primordios radicales, y que es necesario un correcto transporte y una correcta respuesta a las auxinas para poder desarrollar las raíces laterales.

Para poder entender y explicar estos resultados, se analizaron los niveles de la proteína MYC-SKP2A en los diferentes mutantes de auxinas utilizados (figura 34). Los niveles de MYC-SKP2A en el fondo mutante *aux1-7* fueron menores que los encontrados en la línea parental MYC-SKP2A^{OE}, pero muy superiores a los acumulados en el fondo *tir1-1*, mientras que la expresión del mRNA de *MYC-SKP2A* fue similar en ambos casos. Así, estos resultados indican que la estabilidad de la proteína MYC-SKP2A, y por tanto su función, son dependientes de la correcta homeostasis de la respuesta a auxina.

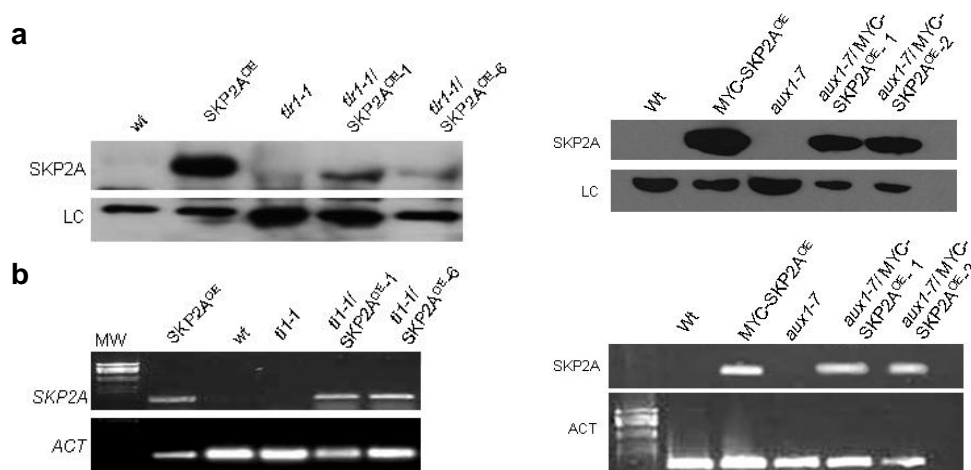


Figure 34. a: Detección de los niveles de MYC-SKP2A por western-blot en el fondo mutante *tir1-1* y *aux1-7*. El extracto de proteína total se obtuvo a partir de plántulas MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 5d en medio MS. **b:** Niveles de expresión del transgen analizados por RT-PCR. Se usó un control de actina (ACT).

5.7.2 La auxina regula la estabilidad de SKP2A

Como se mostró anteriormente, MYC-SKP2A se degradaba a través de la ruta UPS (apartado 5.6.2.). Con el fin de estudiar si la degradación de MYC-SKP2A estuviera determinada por un control hormonal, se trataron plántulas de MYC-SKP2A^{OE} con diferentes tipos de hormonas encontrando que la auxina (2,4-D) producía una reducción relevante de los niveles de MYC-SKP2A.

Para estudiar más en profundidad la influencia de la auxina, se realizaron experimentos de degradación de una proteína control MYC-GFP y de MYC-SKP2A a lo largo del tiempo, usando plántulas tratadas con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas, y con o sin 2,4-D. En la figura 35a podemos ver que los niveles del control MYC-GFP fueron constantes a lo largo del tiempo hasta los 120min, mientras que los niveles de la proteína MYC-SKP2A tratadas con o sin auxina fueron similares durante los primeros 30 minutos, tras lo cual los niveles en las plantas tratadas con auxina se redujeron significativamente. Estos resultados sugerían que la presencia de auxina en el medio podría estar estimulando la degradación de MYC-SKP2A. Con el fin de profundizar en el efecto de las auxinas en la estabilidad de MYC-SKP2A, se analizaron los niveles de la proteína en presencia de terfestatina A, compuesto que bloquea la respuesta a auxina (Yamazoe *et al.*, 2005). Para probar su efecto, se crecieron plántulas de MYC-GFP y MYC-SKP2A^{OE} durante 5 días en medio MS y se trataron durante 32h con terfestatina A. Posteriormente, se analizaron los niveles de MYC-SKP2A y MYC-GFP mediante western-blot, como se muestra en la figura 35b. La terfestatina A provocó un claro acumulo de la proteína MYC-SKP2A, pero no afectó a los niveles de MYC-GFP. Esto indica que la respuesta a las auxinas es necesaria para la degradación de MYC-SKP2A.

En vista de estos resultados, se analizó también la estabilidad de SKP2A en los mutantes de respuesta a auxina *axr2* y *axr3*. Estos mutantes se caracterizan una ganancia de función debido a la hiper-estabilización de las proteínas represoras Aux/IAA (Timppte *et al.*, 1994; Nagpal *et al.*, 2000; Rousse *et al.*, 1998; Overvoorde *et al.*, 2005). Las plantas MYC-SKP2A^{OE}, *axr2*, *axr3*, *axr2*/MYC-SKP2A^{OE}-1, *axr2*/MYC-SKP2A^{OE}-2, y *axr3*/MYC-SKP2A^{OE} se sembraron durante 5 días en medio MS y los niveles de MYC-SKP2A se analizaron mediante inmuno-detección. En la figura 35c se observa que los mutantes *axr2* y *axr3* apenas acumularon proteína MYC-SKP2A. Similar al ejemplo mostrado con *tir1-1*, estos resultados sugieren que las perturbaciones en la homeostasis de la respuesta a auxina son claves para la estabilidad de la proteína MYC-SKP2A.

Para obtener más evidencias genéticas de la degradación de SKP2A, se realizaron cruces de plantas MYC-SKP2A^{OE} con el mutante *axr1-12*, el cual tiene afectado la modificación de CUL1 y reducida la respuesta a auxinas. En la figura 35d se observa que la proteína MYC-SKP2A se acumuló ligeramente en este mutante. Por último, ya que se conocía que E2FC era una diana de degradación de la proteína SKP2A (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006), se desarrolló un ensayo para observar los niveles del complejo E2FC en plantas silvestres crecidas durante 5 días en medio MS y tratadas con o sin 2,4-D durante 6 horas. En las plantas tratadas con auxina se encontró que los niveles de E2FC estaban aumentados, posiblemente debido a la falta de función de la proteína MYC-SKP2A que estaba siendo degradada por la auxina (figura 35e).

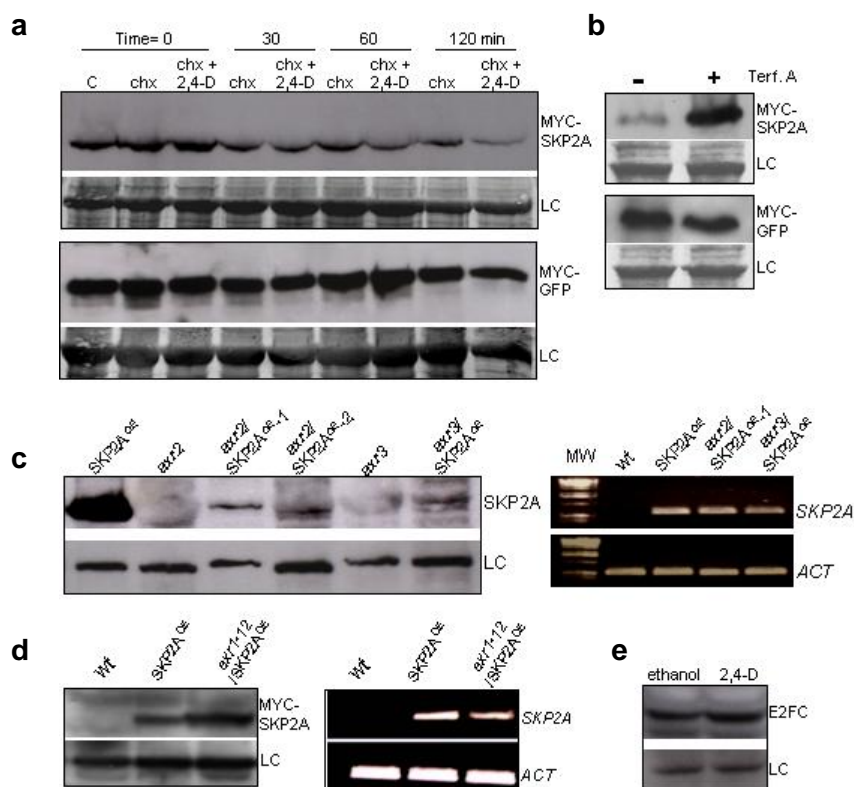


Figura 35. a: Ensayos de degradación de plántulas MYC-GFP y MYC-SKP2A^{OE} crecidas en MS durante 5 días y tratadas con 1 μ M de 2,4-D y 100 μ M de cicloheximida (CHX) en medio MS líquido. La proteína MYC-SKP2A se detectó usando un anticuerpo anti-MYC. LC: control de carga con azul Coomassie. **b:** Western-blot frente a MYC usando extractos de plántulas MYC-GFP y MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 5 días en medio MS y tratadas con(+)/sin(-) terfestatina A (Terf. A) en medio MS líquido. **c:** Detección de la expresión de MYC-SKP2A en plántulas MYC-SKP2A^{OE}, *axr2*, *axr3*, *axr2*/MYC-SKP2A^{OE}-1, *axr2*/MYC-SKP2A^{OE}-2, *axr3*/MYC-SKP2A^{OE} crecidas 5 días en MS. La proteína MYC-SKP2A se detectó usando un anticuerpo anti-MYC y los niveles de mRNA mediante RT-PCR. Como control se amplificó el gen de la actina (ACT). **d:** Detección de la expresión de MYC-SKP2A en plántulas MYC-SKP2A^{OE} y *axr1-12*/MYC-SKP2A^{OE} de 5 días por western-blot frente a MYC, y comprobación de la presencia de la proteína por RT-PCR usando ACT como control. **e:** Detección de la presencia del complejo E2FC usando un anticuerpo frente E2FC, en extractos de proteína total de plántulas silvestres crecidas durante 5 días en MS y tratadas con 2,4-D o EtOH. En los controles de carga (LC) aparecen bandas de reactividad cruzada inespecíficas.

Para analizar el efecto de las auxinas sobre la degradación de SKP2A, se llevaron a cabo ensayos de degradación *in vitro* en un sistema libre de células, con extractos proteicos de plantas MYC-SKP2A^{OE}. Al realizar el ensayo de degradación *in vitro* en presencia de 2,4-D, se observó que la proteína MYC-SKP2A se degradaba más rápidamente en presencia de la hormona, desapareciendo la proteína a los 20 minutos (figura 36a y 36b). Así, la presencia de auxina en el extracto aceleró la degradación de MYC-SKP2A.

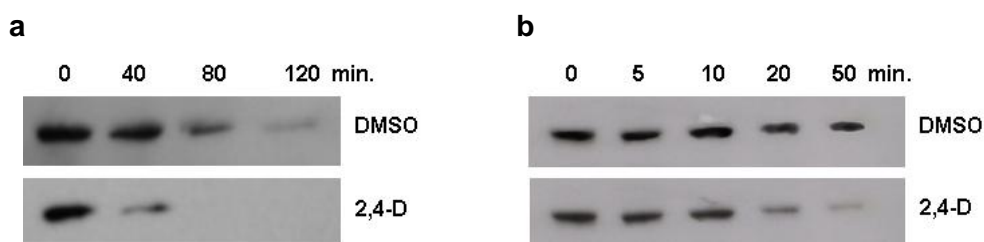


Figura 36. a: Ensayo de degradación *in vitro* de la proteína MYC-SKP2A a diferentes tiempos (0, 40, 80 y 120 minutos) en presencia de DMSO o de 1 μ M de 2,4-D. El extracto de proteína total se obtuvo a partir de plantas MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 5 días en MS. Los extractos se incubaron a 30°C y se detectó la presencia de MYC-SKP2A usando un anticuerpo anti-MYC. **b:** Ensayo de degradación de MYC-SKP2A a tiempos más cortos (0, 5, 10, 20 y 50 minutos) en presencia de DMSO o 1 μ M de 2,4-D.

5.7.3 SKP2A une auxina

En este trabajo se ha descrito una clara relación entre la hormona auxina y la proteína SKP2A. La auxina promueve la degradación de SKP2A a través del sistema UPS de forma directa. Los ensayos de degradación en presencia de 2,4-D mostraron que la auxina aceleró cuatro veces la degradación de SKP2A. Sin embargo, en este punto se desconocía cómo se llevaba a cabo esta regulación. Por un lado, era razonable pensar que si la auxina estaba estimulando la degradación de SKP2A, el receptor de auxinas TIR1 pudiera tener un papel relevante en su degradación. Sin embargo, los niveles de SKP2A fueron menores en el mutante *tir1-1*, sugiriendo que el complejo SCF^{TIR1} no podía ser la E3 responsable de su degradación. La información proporcionada por los mutantes *axr1-12*, *axr2*, *axr3*, *aux1-7* y el propio *tir1-1*, parece indicar que los correctos niveles de auxina son fundamentales para la estabilidad y la función de MYC-SKP2A. Otra posibilidad es que la auxina se pudiera estar uniendo a SKP2A para regular su estabilidad. Para comprobar esto, se realizó un nuevo ensayo de degradación de MYC-SKP2A a diferentes tiempos en presencia de 2,4-D, de la forma natural IAA, de las formas biológicamente activas 1-NAA o IBA, y de la forma inactiva 2-NAA. Como

podemos ver en la figura 37, la forma IAA fue la que más rápidamente estimuló la degradación de MYC-SKP2A, mientras que la forma inactiva 2-NAA no pareció contribuir la degradación. Por tanto, parece que es la forma natural IAA la que promueve la degradación de MYC-SKP2A de forma más eficiente.

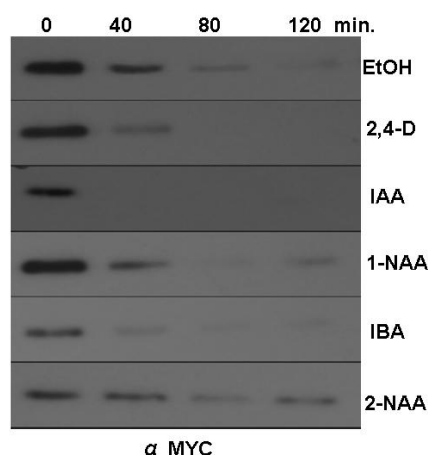


Figura 37. Ensayo de degradación *in vitro* a partir de extractos de proteína total obtenidos de plántulas MYC-SKP2A^{OE} crecidas durante 6d en medio MS. Los extractos se incubaron a 30°C con diferentes tipos de auxinas a concentración 1 μ M: 2,4-D, IAA, 1-NAA, IBA y 2-NAA, o bien con DMSO. La proteína MYC-SKP2A se detectó con un anticuerpo anti-MYC.

SKP2A es una proteína de tipo *F-box* que presenta una gran zona de repeticiones de leucina (LRR). En la actualidad, hay casos descritos de dominios LRR con capacidad para unirse directamente a hormonas, como es el caso de COI1 que une jasmonico (Yan *et al.*, 2009), BRI1 que une brasinoesteroides (Kinoshita *et al.*, 2005) o los receptores de auxina TIR1 y TIR1-like (AFBs), que unen auxina (Tan *et al.*, 2007; Bertosa *et al.*, 2008). Con estos antecedentes, podría ser factible que SKP2A uniera auxinas. Para comprobar esta posibilidad, se usó la información publicada de los cristales de SKP2 de humanos y del receptor TIR1 (Schulman *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2007). Para ello, lo primero se determinó fue la estructura tridimensional *in silico* de la proteína SKP2A (figura 38) a partir de los datos cristalográficos de la proteína HsSKP2. La estructura calculada para SKP2A consta de un dominio *F-box* formado por 3 hélices en posición N-t, una gran zona de repeticiones de leucina (LRR) que abarcaría desde el residuo 46 al 302, y una cola de 30 residuos en posición C-t sin estructura definida. El dominio LRR está formado por 9 hélices en el lado convexo y 10 láminas β en el lado cóncavo.

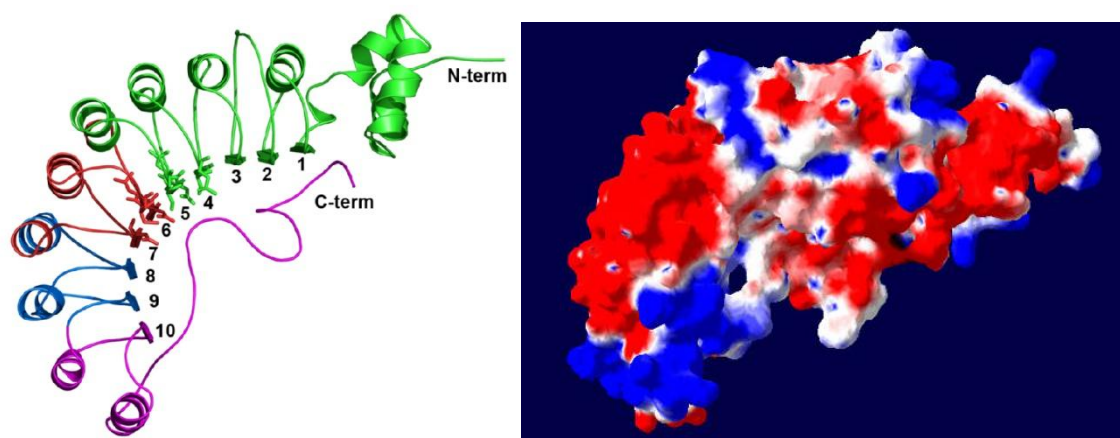


Figura 38: Modelos *in silico* de la estructura tridimensional de la proteína SKP2A realizado a partir de los datos cristalográficos de la proteína SKP2 de humanos.

Para analizar la posible unión de la auxina, se generó una batería de proteínas SKP2A silvestres, mutantes y truncadas fusionadas a la *Maltosa Binding Protein* (MBP). Estas proteínas recombinantes se expresaron en bacteria y se unieron a bolas de amilosa. Las proteínas unidas a las bolas se utilizaron para ensayos de unión con auxina marcada radiactivamente. Primero, para analizar la posible unión de SKP2A a la auxina, se incubaron las proteínas MBP-SKP2A o el control MBP con 50 nM [3 H]-IAA en 500 μ l PBS-Tween 0,1%. La proteína MBP-SKP2B se usó también como control, ya que es una proteína con un 83% de homología con SKP2A. Las tres muestras se incubaron durante 1 hora y se lavaron 3 veces durante 3 minutos con 1ml PBS-Tween 0,1%. La cantidad de auxina unida a las proteínas recombinantes se midió contando las cuentas por minuto (d.p.m) en un contador de centelleo. Como se observa en la figura 39a, mientras los niveles de los controles MBP y MBP-SKP2B alcanzaron valores de aproximadamente 1000 d.p.m., la auxina retenida por MBP-SKP2A fue tres veces más, alcanzando un valor medio de 3000 d.p.m. Para asegurarnos de que esta unión a auxina se estaba produciendo de manera específica, se realizó un ensayo de competición con distintas concentraciones de auxina fría (0, 1, 10 y 100 μ M) (figura 39b). Los resultados mostraron que los niveles de MBP y MBP-SKP2B oscilaban de forma más o menos constante sobre las 1000 d.p.m., independientemente de la cantidad de auxina fría que hubiera en el medio. Sin embargo, los niveles de auxina radiactiva retenida por MBP-SKP2A disminuyeron drásticamente según se incrementaban los niveles de auxina fría (figura 39b). En este caso, el descenso de la cantidad de [3 H]-IAA llegó a alcanzar un máximo de saturación en 1 μ M, a partir del cual, las d.p.m de la auxina marcada ya no

disminuyeron de forma proporcional al incremento de auxina fría. Estos datos indicaban que la unión a auxina por parte de MBP-SKP2A parecía estar produciéndose de forma específica. Para corroborarlo, se realizó un segundo ensayo de competición usando distintas concentraciones (0, 1, 10 y 100 μM) de una auxina biológicamente activa (1-NAA), y de la inactiva 2-NAA, junto con 50 nM de [^3H]-IAA. La figura 39c muestra que la forma inactiva 2-NAA no compitió con [^3H]-IAA, mientras que la forma biológicamente activa 1-NAA sí compitió con [^3H]-IAA por la unión a MBP-SKP2A, hasta alcanzar un punto de saturación en 10 μM .

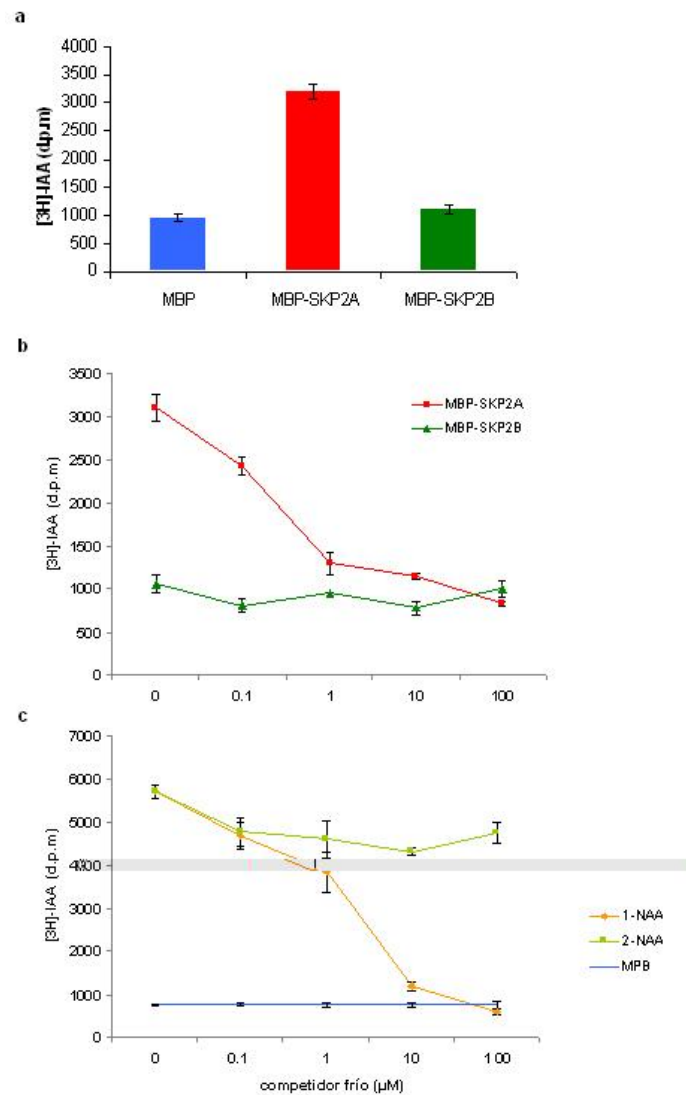


Figura 39: **a:** Ensayo de unión de [^3H]-IAA con proteínas MBP, MBP-SKP2A y MBP-SKP2B. Los datos representados son la media y la desviación estándar de las d.p.m detectadas en el contador de centelleo líquido, de tres experimentos independientes. **b:** Ensayo de competición a distintas concentraciones de IAA frío (0, 1, 10 y 100 mM) y una concentración constante de [^3H]-IAA a 50 nM. La unión de [^3H]-IAA a MBP-SKP2A o a MBP-SKP2B se midió como d.p.m en el contador de centelleo líquido, en tres experimentos independientes. **c:** Ensayo de competición a distintas concentraciones de 1-NAA frío o de 2-NAA frío (0, 1, 10 y 100 mM), y una concentración constante de [^3H]-IAA a 50 nM. La unión de [^3H]-IAA a MBP o a MBP-SKP2A se midió como d.p.m en el contador de centelleo líquido, en tres experimentos independientes.

Por lo tanto, estos datos mostraron que sólo las formas de auxinas biológicamente activas compitieron por la unión a MBP-SKP2A, y que además fue la forma natural IAA la que presentó mayor capacidad para unirse a MBP-SKP2A, ya que se necesitó menos cantidad para saturar la unión (1 μ M frente a los 10 μ M de 1-NAA). Mediante un análisis de Scatchard, se calculó la constante de disociación para IAA frente a MBP-SKP2A en K_d = 120 nM, y la concentración media inhibitoria IC_{50} = 0,65 μ M, mientras que para 1-NAA fue de 2.5 μ M. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos para TIR1 (K_d = 84 nM, IC_{50} =0,12 μ M). Todos estos resultados permitieron especular con la posibilidad de que SKP2A pudiera unirse a auxinas, tal y como lo hace su receptor TIR1. Por ello, se decidió investigar cuál era la posible región de unión a la auxina.

Con el fin de identificar la posible zona de unión, se generaron distintas construcciones truncadas de la proteína SKP2A, con deleciones de 50 en 50 aminoácidos desde la región C-t (SKP2A-T1-T4) (figura 40).

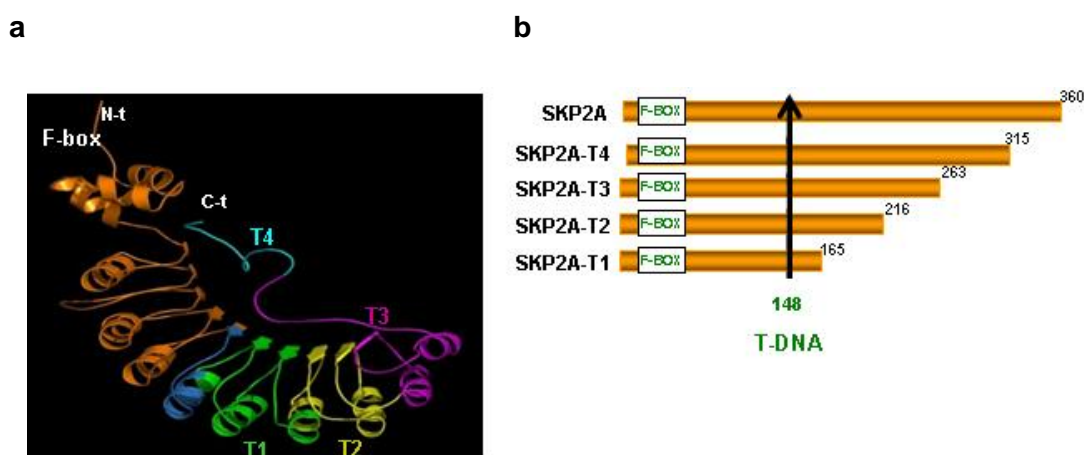


Figura 40: **a:** Estructura *in silico* de SKP2A desarrollada a partir de los datos cristalográficos de SKP2 de humanos, donde se indican las deleciones realizadas para generar las distintas proteínas truncadas de SKP2A. La región en azul oscuro señala donde se insertó el T-ADN en el mutante *skp2a*. **b:** Representación esquemática de las diferentes deleciones usadas para generar las proteínas truncadas de SKP2A. Los números finales indican el último aa existente en cada versión truncada, y la flecha el sitio de inserción del T-ADN.

Estas proteínas truncadas, fusionadas a la MBP, se usaron en ensayos de unión a [3 H]-IAA. Como se observa en la figura 41, MBP-SKP2A-T4 presentó una ligera disminución en su capacidad de unión a [3 H]-IAA, mientras que MBP-SKP2A-T3 redujo su capacidad de unión a la auxina marcada alrededor de un 40%. Al analizar las

construcciones MBP-SKP2A-T1 y MBP-SKP2A-T2, se observó que la capacidad de unión estaba drásticamente disminuida.

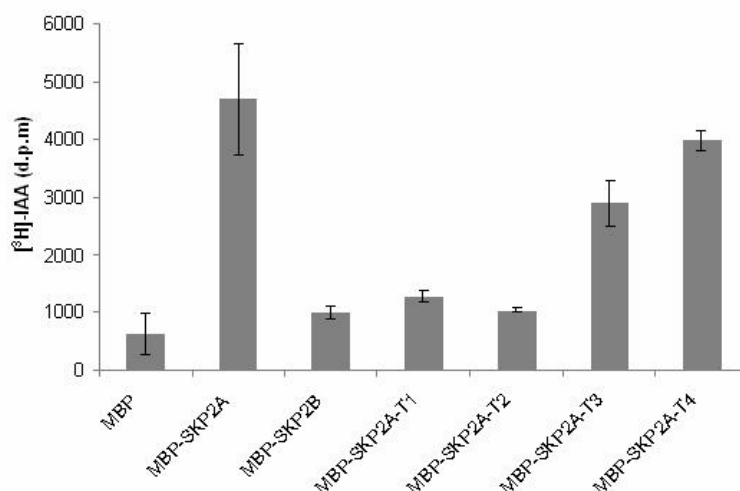


Figura 41: Ensayo de unión a [³H]-IAA 50 nM con las proteínas truncadas MBP-SKP2A-T1, MBP-SKP2A-T2, MBP-SKP2A-T3 y MBP-SKP2A-T4, y las proteínas MBP, MBP-SKP2A y MBP-SKP2B. Los datos representados son la media y la desviación estándar de las d.p.m detectadas en el contador de centelleo líquido, en tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que la región comprendida entre las construcciones T2 y T3, pudiera contener residuos necesarios para la unión a auxina, o bien, que la delección de un gran fragmento de la proteína pudiera desestabilizar esta unión al desorganizar la estructura tridimensional de SKP2A. Para discernir entre ambas posibilidades, se procedió a la identificación de los aminoácidos implicados en la unión a auxina, con el apoyo de un análisis bioinformático y basándonos en los datos ya conocidos y publicados de la estructura de TIR1 (Tan *et al.*, 2007). TIR1 presenta el doble de motivos LRR y más pliegues en forma de herradura solenoide que el modelo calculado para SKP2A. El lugar de unión a auxinas en TIR1 se localiza en la superficie interior del solenoide, y comprende principalmente los residuos entre las posiciones 403 y 489. Superponiendo la estructura de SKP2A y la mitad C-terminal de TIR1 (residuos 300-594), se seleccionaron un conjunto de residuos en SKP2A que se encontraban en un radio alrededor de 4,0 Å de distancia de la molécula de IAA unida a TIR1 (figura 42).



Figura 42: Representación en tres dimensiones de la superposición entre las regiones LRR de SKP2A (verde) y la mitad C-terminal de la estructura de TIR1, que comprende los residuos 300-594 encargados de la unión a auxina (gris). Los residuos localizados en un radio de 4.0 Å alrededor de la molécula de auxina (magenta) unida a TIR1 se representan como barras.

Este procedimiento permitió seleccionar un conjunto de posibles residuos de SKP2A implicados en la unión a la auxina. Estos residuos se utilizaron como primer sitio probable de acoplamiento para la estructura de IAA, y como punto de partida de sucesivas rondas de acoplamiento molecular. El acoplamiento se repitió de una forma más fina, mediante el uso de cálculos de mecánica molecular y siempre con la limitación de mantener la conformación original de la proteína. Por último, se realizaron cálculos cuánticos para optimizar la geometría de la auxina en la estructura teniendo en cuenta los efectos de los electrones en la interacción, y obteniendo finalmente un conjunto de 11 aminoácidos (figura 43a). Estos cálculos predijeron un probable sitio de unión que implicaba a los residuos: S127, L128, N149, S151, G152, N175, C177 y N202, así como a los átomos de los residuos L150, G178 y L176, con una energía de interacción aproximada de 34 kcal mol (figura 43b). El grupo NH del anillo indólico de la auxina era capaz de formar puentes de hidrógeno con los residuos C177 y S151. En ausencia de sustrato, el grupo hidroxilo de S151 podía formar un puente de hidrógeno ($\text{O-H}\cdots\text{O}$) con el oxígeno de un grupo carbonilo cercano, mientras el C177 podía formar un puente disulfuro con el hidrógeno del grupo NH de N175 (figura 43a). En

presencia de auxina, la torsión entre estos dos residuos S151-OH y C177-SH, junto con la distancia del puente de hidrógeno del grupo indol, estabilizaban el complejo. Los cálculos de la posición del anillo fenólico de auxina, permitieron además determinar una posible interacción del tipo $N-H \cdots \pi$ con el grupo NH_2 del residuo N202, localizado a una distancia cercana de 3,9 Å. Esta interacción de puente de hidrógeno es débil, y aparece a una distancia $N \cdots X < 4,3$ Å, siendo X el centro del sistema π . Es bien conocido que este tipo de interacciones contribuyen notablemente a estabilizar estructuras locales en las proteínas (Steiner *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2001). Con este estudio se identificaron además numerosas interacciones similares a las halladas en la estructura cristalina de TIR1-IAA. En TIR1, el grupo carboxilo ancla también la auxina formando 2 puentes de hidrógeno con dos residuos cercanos: R403 y S438. El grupo NH del anillo indólico de la auxina también forma 2 puentes de hidrógeno en TIR1 con los oxígenos de los residuos L404 y L439, mientras que un residuo cercano, el S462, posee también una orientación que permitiría un puente de hidrógeno $O-H \cdots \pi$ con la nube π del anillo fenólico de la auxina (Tan *et al.*, 2007). El potencial electrostático PB (Poisson- Boltzmann) calculado determinó la existencia de una gran región positiva que abarcaba la mayor parte de la zona cóncava del dominio LRR (figura 43b). El sitio de unión a la auxina se encontró en un lugar de potencial neutro, justo en el borde del área con carga positiva. El potencial neutro favorecía la interacción con el anillo apolar de la auxina, mientras que la región de potencial positivo se localizó cercana al grupo carboxilo. La superficie del residuo L128 de SKP2A presentó una protuberancia que favorecía la formación de una pared con el bolsillo de unión a la auxina con potencial electrostático neutro, que permitiría la interacción con la fracción de auxina apolar entre el grupo carboxilo y el nitrógeno (figura 43b).

Por otro lado, la proteína SKP2B, con un 83% de homología con SKP2A, presentó baja capacidad para unir a auxina. El alineamiento de secuencias mostró que sólo el residuo en la posición 128 era diferente entre SKP2A (leucina) y SKP2B (serina) (figura 44). Esta serina tiene un potencial de carga que impide las interacciones apolares con un sustrato hidrofóbico, además de una superficie más pequeña que la leucina, por lo que prácticamente hace desaparecer la pared necesaria para que se forme el sitio de unión a la auxina. Para validar estos análisis de *docking*, era necesario trasladar los datos bioinformáticos a ensayos experimentales, para lo cual se generaron distintos mutantes puntuales de SKP2A que se usaron para analizar su capacidad de unir auxinas.

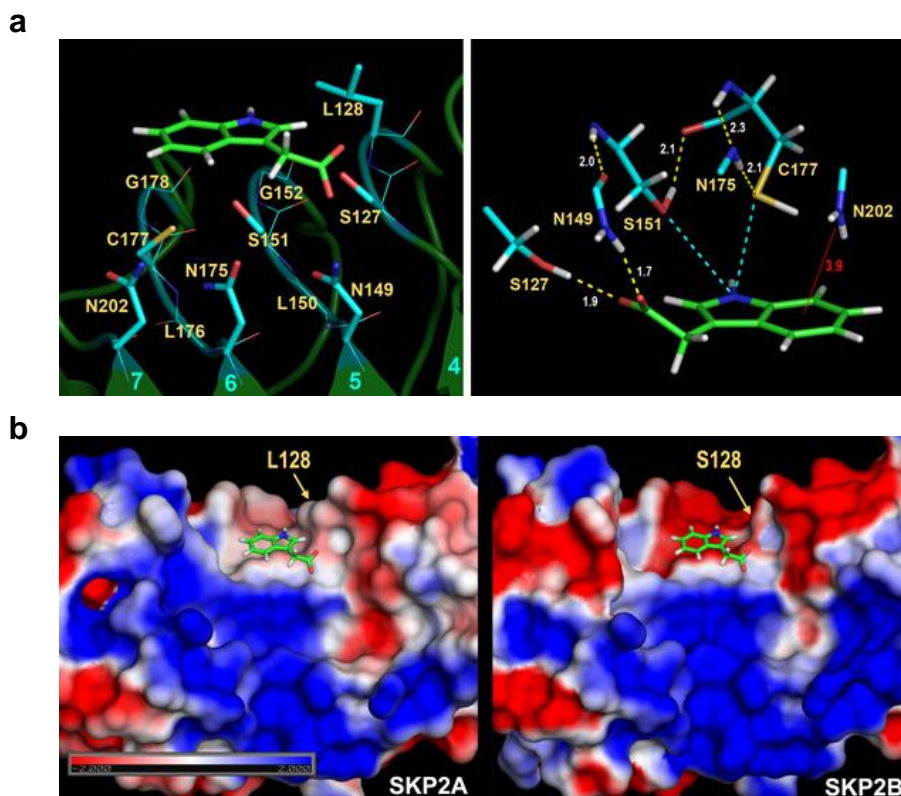


Figura 43: a: Modelización de la estructura de la proteína SKP2A y de un sitio de unión a auxinas. La molécula de auxina (verde) se acopla a lugar de unión rodeado de 11 residuos (cian). Los números en cian indican los plegamientos del dominio LRR, los cuales se muestran también en la figura 42 como barras de color verde oscuro. Los puentes entre átomos se representan como líneas discontinuas y los puentes entre átomos de cada lado de la cadena implicados en la interacción, se representan como barras. El panel derecho muestra una vista en detalle de la interacción entre la molécula de auxina y los aminoácidos implicados en la interacción hallados mediante cálculos cuánticos. Las líneas de puntos amarillos representan los puentes de hidrógeno con rótulos numéricos que indican la distancia, en Å, de $H \cdots X$. Las líneas de puntos color cian representan los puentes de hidrógeno que dependen de la rotación interna del grupo OH de S151 y del grupo SH de C177. La línea roja representa una posible interacción del tipo $NH \cdots \pi$ entre un grupo de NH_2 de N202 y la nube de electrones π del anillo aromático de la auxina. El color rojo indica la distancia en Å entre el átomo N y el centro de este anillo. Los átomos son representados como C: verde claro y cian, N: azul, O: rojo, S: amarillo, H: blanco. **b:** Representación del potencial electrostático de SKP2A y SKP2B. La superficie molecular de SKP2A y SKP2B, y su potencial electrostático (PB) asignado a la superficie se representa con códigos de color: positivo $+2.0$ kT/e (azul) y el negativo -2.0 kT/e (rojo). Observamos en detalle la parte cóncava del dominio LRR con el acoplamiento de una molécula de auxina (verde). Las flechas indican la localización de la L128 en SKP2A, que en SKP2B está cambiada por una serina. El potencial de la parte cóncava que estaría formando en SKP2A y en SKP2B el posible bolsillo de unión a auxinas muestra diferente color: SKP2A potencial neutro y SKP2B potencial negativo.

Los datos bioinformáticos apuntaban a que el residuo S151 era importante para la formación de un puente de hidrógeno con la auxina, por ello se decidió sustituir este aminoácido en SKP2A por una alanina (MBP-SKP2A-[S151A]). Esta proteína mutante se incubó en PBS-Tween 20 0,1% con 50 nM de $[^3H]$ -IAA, y tras varios lavados, su unión a auxina se cuantificó mediante d.p.m. en un contador de centelleo líquido. Como se observa en la figura 45a, la cantidad de radiactividad retenida por la proteína MBP-SKP2A-[S151A] se redujo en casi un 60% en comparación con la proteína control.

Estos datos estarían indicando que la serina en la posición 151 es importante para formar un sitio de unión a auxinas en SKP2A. A partir de los datos obtenidos con la comparación de secuencias de SKP2A y SKP2B, sólo un aminoácido que difería entre ambas parecía potencialmente implicado en la interacción con auxinas. Por ello, se generó una nueva proteína mutante de SKP2A (MBP-SKP2A-[L128S]), en el que la leucina se sustituyó por una serina. Se ensayó la capacidad de unión a auxina de esta proteína, y tal y como podemos ver en la figura 45b, este mutante también presentó una disminución en su capacidad de unión a auxina de un 60%, aproximadamente. De igual manera, el doble mutante MBP-SKP2A-[S;L] que portaba una mutación de la S151 y de la L128, mostró también la misma disminución. Asumimos, por tanto, que este 40% restante de capacidad de unión a auxina puede ser debido al fondo del propio experimento.

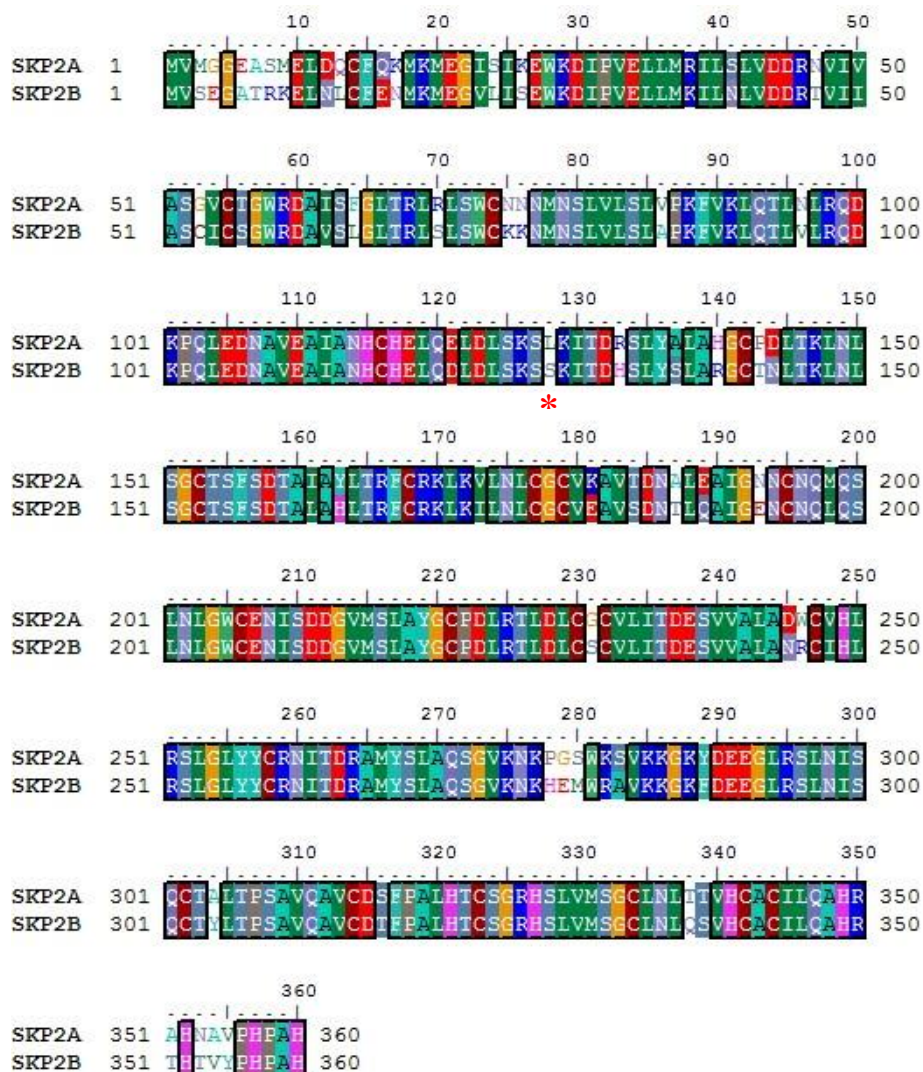


Figura 44. Alineamiento de las secuencias de las proteínas SKP2A y SKP2B. Los aminoácidos distintos entre las dos secuencias aparecen en colores claros sin recuadrar. El asterisco rojo señala los distintos aminoácidos en posición 128 entre SKP2A y SKP2B.

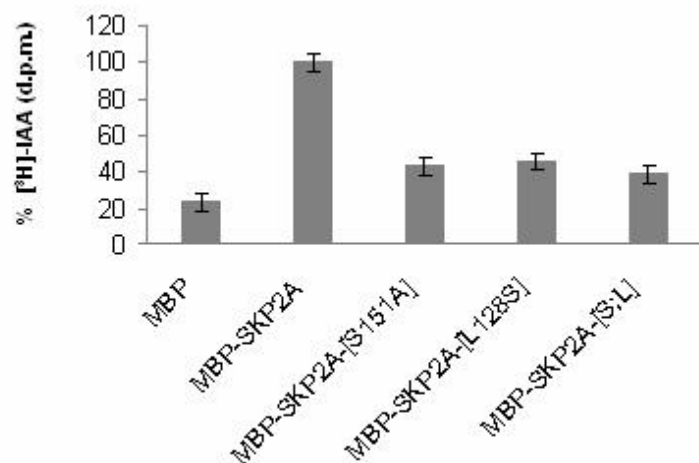


Figura 45. a: Las proteínas recombinantes MBP, MBP-SKP2A, MBP-SKP2A-[S151A], MBP-SKP2A-[L128S] y MBP-SKP2A-[S,L], fueron incubadas durante 1 hora en 500 μ l de PBS-Tween20 0,1%, en presencia de 50 nM [3 H]-IAA. La auxina retenida en las bolas de amilosa se lavó 3 x 3 min y se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Cada valor es la media de tres experimentos independientes. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Los resultados representados son los porcentajes de unión relativos a MBP-SKP2A.

Los análisis de modelización de proteínas habían mostrado que la L128 en SKP2A presentaba una protuberancia apolar que favorecía la interacción hidrofóbica con el anillo aromático de la auxina, y formaba a su vez una pared en el bolsillo de entrada de auxina, con potencial electrostático neutro (figura 46). En SKP2B la posición 128 está ocupada por una serina (S128), esta serina no tiene la protuberancia necesaria para formar la pared del bolsillo ni el potencial favorable para la interacción con un sustrato hidrofóbico. Este fuerte potencial negativo del residuo de serina (figura 46, en rojo) dificulta por tanto cualquier interacción con el anillo aromático de la auxina.

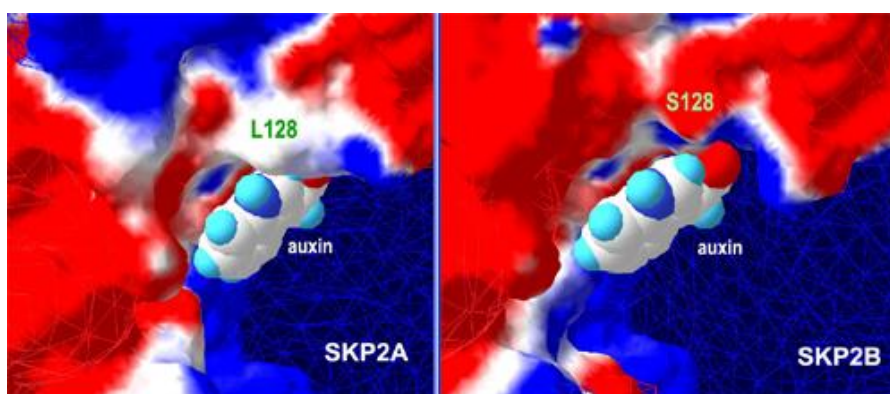
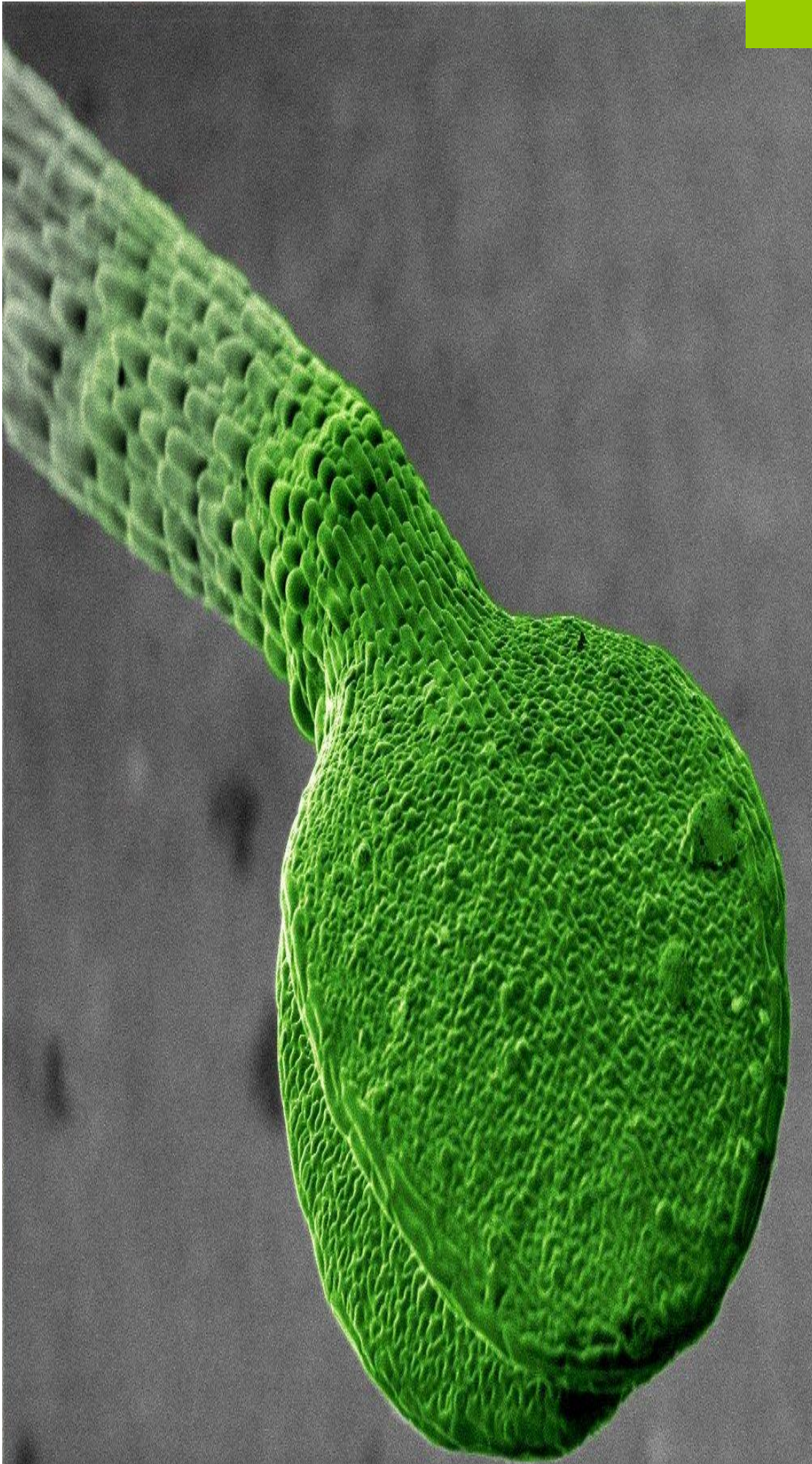


Figura 46: Representación en detalle del posible lugar de unión a auxinas en las proteínas SKP2A y SKP2B, y de su capacidad de unión según contengan una leucina o una serina en la posición 128.

Este modelo podría explicar por qué dos proteínas tan similares en su secuencia, con un 83% de homología, presentan diferencias en su capacidad de unión a auxina. Asimismo, tomados todos los resultados en conjunto, se puede decir que la proteína *F-box* SKP2A presenta un lugar definido para la unión de la auxina.



Cotiledones de 3 días. Darren Wells

SKP2A, ciclo celular y respuesta a las auxinas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el gen *SKP2A* funciona como un regulador positivo del ciclo celular. La expresión de *SKP2A* está regulada a lo largo del ciclo celular, con un pico de expresión en la fase S y otro mayor en mitosis. A nivel de órganos, *SKP2A* se expresa en los meristemos apical y radicular, detectándose mayores niveles en plántulas jóvenes. Por otro lado, la sobreexpresión de *SKP2A* induce la división celular en los meristemos, observándose un mayor número de células en la fase G2/M. Las hojas de estas plantas MYC-SKP2A^{OE} son de un tamaño mayor que las hojas de plantas silvestres, debido a un mayor número de células y a que estas son de mayor tamaño. Asimismo, estas plantas MYC-SKP2A^{OE} generan mayores niveles de biomasa y presentan un mayor número de primordios de raíces laterales. Estos datos indican que *SKP2A* es un regulador positivo de la división celular y del crecimiento. Los resultados de diferentes líneas de investigación, y los datos de este trabajo, encaminan a pensar que *SKP2A* controla el ciclo celular mediante la degradación de distintos reguladores del ciclo celular. Estudios recientes han mostrado que SCF^{SKP2A} regula la estabilidad del represor de ciclo celular E2FC y DPB (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008). Las plantas MYC-SKP2A^{OE} muestran un fenotipo similar, en algunos aspectos, a las plantas con bajos niveles de E2FC, tales como el aumento del marcador CYCB1-GUS, el alto número de primordios de raíces laterales o la disminución del nivel de ploidía del ADN (del Pozo *et al.*, 2006). Asimismo, la sobreexpresión de E2FC reduce drásticamente los niveles de expresión del marcador de G2/M, CYCB1-GUS. En este trabajo se observó que la sobreexpresión de MYC-SKP2A dentro del fondo genético E2FC^{OE} restablecía los niveles de este marcador, posiblemente mediante la degradación del exceso de E2FC (Jurado *et al.*, 2008). Estos resultados indican que *SKP2A* regula positivamente la división celular degradando, al menos, E2FC y DPB, aunque no se puede descartar que también degrade otras proteínas. De hecho, es posible que cierta parte del fenotipo de las plantas MYC-SKP2A^{OE} se deba a la unión de otros reguladores tales como las proteínas KRP (Ren *et al.*, 2008). SKP2 de humanos recluta para su degradación diferentes reguladores del ciclo celular como p27 (Tsvetkov *et al.*, 1999), ciclina E (Nakayama *et al.*, 2001), E2F1 (Marti *et al.*, 1999), CDK9 (Kierman *et al.*, 2001), RB-like p130 (Tedesco *et al.*, 2002), p57kip2 (Kamura *et al.*, 2003) y CDT1 (Li *et al.*, 2003), por lo que sería esperable que *SKP2A* se uniera también a otros reguladores de ciclo celular, además de a los ya descritos.

Como ya se comentó en los resultados de esta Tesis, las plantas MYC-SKP2A^{OE} desarrollan un número mayor de primordios de raíces laterales (PRL), y muestran una reducción de la distancia de la posición del primer primordio con respecto al extremo del meristemo radicular. La formación de los primordios de raíces laterales implica que las células del periciclo próximas al xilema, células fundadoras, que están paradas en la fase G1, tengan que reactivar el proceso de división celular (Casimiro *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2006). Datos genéticos han mostrado que la auxina promueve la proliferación de estas células fundadoras para que se produzca la formación y el desarrollo de estos primordios (Fukaki *et al.*, 2002; Benkova *et al.*, 2003; Himanen *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2005). La respuesta a las auxinas de estas células es clave para el desarrollo de RL (Vanneste *et al.*, 2005), ya que los mutantes que tienen impedida esta respuesta no forman PRL. Asimismo, cuando las plántulas son tratadas con auxina en el medio, los procesos tempranos del desarrollo de RL (las primeras divisiones anticlinales y periclinales) se sincronizan a lo largo de toda la longitud de la raíz (Laskowski *et al.*, 1995). La formación de las RL requiere una correcta respuesta a las auxinas e implica la proteólisis específica de los reguladores negativos Aux/IAA, por parte de los complejos SCF^{TIR1/AFB} (Gray *et al.*, 1999; Dharmasiri y Estelle, 2002). Asimismo, también se requiere las respuestas tardías que implican la degradación de NAC1 por parte de la E3 SINAT5 (Xie *et al.*, 2002). La baja actividad de los complejos SCF^{TIR1} o de la ruta AXR1-RUB, que reduce la respuesta a auxina, reduce también el número de raíces laterales formadas (Ruegger *et al.*, 1998; Lincoln *et al.*, 1990; del Pozo *et al.*, 2002). En la bibliografía se encuentran datos de mutaciones a nivel de otras enzimas E3 ubiquitina ligasas que también afectan al desarrollo de la formación de raíces laterales. Este es el caso de las proteínas XBAT32 y ARABIDILLO-1 y 2, enzimas E3 con actividad ubiquitina ligasa, cuyos mutantes presentan numerosos defectos fenotípicos, tales como la reducción de la formación de RL. Para XBAT32 todavía no se han descrito sus proteínas diana (Nodzon *et al.*, 2004; Coates *et al.*, 2006). No obstante, parece que los complejos E3 implicados en la ruta UPS parecen jugar un papel relevante en la formación y en el desarrollo de RL.

En nuestro caso, los análisis fenotípicos del mutante *skp2a* no han mostrado diferencias significativas en el número de RL formadas respecto a las plantas silvestres. Sin embargo, la sobreexpresión de MYC-SKP2A aumenta significativamente el número de PRL, aunque este aumento es dependiente de la respuesta a las auxinas. Las plantas MYC-SKP2A^{OE} presentan también mayores niveles de expresión de DR5::GUS en los

meristemos y en las zonas de diferenciación. Estos niveles pueden deberse a que la sobreexpresión de MYC-SKP2A amplifique la respuesta a auxina, o bien, a que la auxina se acumule a nivel radicular. El hecho de que las plantas MYC-SKP2A^{OE} tratadas con auxina también presenten mayores niveles de DR5::GUS, nos hace inclinarnos por la primera posibilidad, aunque en este momento no podemos descartar todavía ninguna de las dos opciones.

Los datos genéticos obtenidos a partir de los cruces de MYC-SKP2A^{OE} con los mutantes *axr1-12*, *tir1-1* y *slr1-1* han mostrado que la función de SKP2A en la formación de PRL es dependiente de auxinas, ya que en estos mutantes la sobreexpresión de MYC-SKP2A no induce la formación de PRL. Los datos obtenidos a partir del mutante *axr1-12* indican que SKP2A estaría funcionando aguas arriba del gen *AXR1*, o bien que la función de *AXR1*, que regula la actividad de CUL1 (un componente del SCF), es necesaria para el correcto funcionamiento del complejo SCF^{SKP2A}. Para poder obtener datos más concretos, se analizaron los mutantes *slr1-1* y *tir1-1*, que son reguladores directos y específicos de la respuesta auxina. El gen *SLR* codifica para el factor transcripcional de respuesta a auxina IAA14, cuya degradación es requerida para la formación de las raíces laterales. Tampoco la sobreexpresión de MYC-SKP2A en el mutante *slr1-1* promueve la formación de RL. Nuestros resultados con el mutante *tir1-1* han mostrado que los niveles de MYC-SKP2A se degradaban en el mutante, y que la sobreexpresión de MYC-SKP2A tampoco podía inducir por sí misma el desarrollo de RL. Parece, por tanto, que la sobreexpresión de los reguladores de ciclo celular en las células del periciclo puede promover la división celular, pero que por sí misma no sería suficiente para el desarrollo de RL si no existe una correcta respuesta a auxina (Vanneste *et al.*, 2005). De igual modo, la sobreexpresión de MYC-SKP2A en los mutantes *aux1-7*, favorecen la formación de PRL, pero este aumento no se traduce finalmente en un mayor número de RL. Este mutante *aux1-7*, además de caracterizarse por poseer resistencia a auxinas y etileno, y por su reducido número de RL, presenta también alteraciones en el gravitropismo de las plantas. En la raíz, los amiloplastos o estatocitos son los receptores del vector de la gravedad (Boonsirichai *et al.*, 2002). Los iones de Ca²⁺ y la auxina se localizan por igual en las células de la corteza, promoviendo la elongación a favor de la gravedad. Cuando la raíz crece en horizontal, los estatolitos caen por su propio peso hacia las paredes laterales de las células, debido a la densidad del almidón. Esto dispara el transporte de Ca²⁺ y auxina hacia una sola mitad de la cofia. Las diferencias en la concentración de auxinas en el meristemo

radicular induce el crecimiento en aquellas zonas de menor concentración e inhibición en las regiones de mayor concentración de auxinas (Ingber, 2003). Así, en la zona cóncava de la curvatura el acumulo de IAA inhibe el crecimiento, mientras que se induce en la parte convexa. AUX1 es el responsable del influjo auxínico y responsable del transporte lateral de la auxina a lo largo de la raíz (Bennet *et al.*, 1996). Como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión de MYC-SKP2A, da lugar a un incremento de la respuesta a auxina y a una mayor tasa de división celular. Esto podría estar revirtiendo parcialmente el fenotipo del mutante *aux1-7* que presenta gradientes de concentración de auxina menores en la estimulación gravitrópica. Así, en las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A la amplificación de la respuesta a las auxinas y la inducción de la proliferación podría favorecer el crecimiento gravitatorio positivo y disminuir así el fenotipo de *aux1-7*.

SKP2A forma parte de un complejo SCF con actividad E3 ubiquitina ligasa

Hasta el momento se conocía por trabajos previos que la proteína SKP2A era una proteína con un motivo-F (*F-box*) que formaba parte de un complejo SCF (*Skp1/Cullin/F-box*). Los complejos SCF constan en plantas de 4 subunidades: CUL1, RBX, ASK1 y proteínas con un motivo-F. Las proteínas CUL1, RBX y ASK1 forman un *core* estructural donde se anclan las proteínas *F-box*, responsables de reclutar a las proteínas diana de forma específica. Por otro lado, también se ha descrito que el complejo SCF^{SKP2A} interacciona con E2FC y DPB, y los reclutaba para su degradación por el proteasoma (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que SKP2A podía estar funcionando como una enzima E3 ubiquitina ligasa. Sin embargo hasta la fecha no se había demostrado su actividad bioquímica como ligasa. En este trabajo se ha demostrado que SKP2A forma parte de un complejo SCF con capacidad de ligar moléculas de ubiquitina a proteínas diana, confirmando así que forma un complejo SCF^{SKP2A} activo.

Las proteínas *F-box* interaccionan con proteínas de la familia ASK a través del motivo F, y son responsables del reconocimiento específico de la proteína diana para su degradación (Patton *et al.*, 1998; Jackson y Eldridge, 2002). Estudios recientes han revelado que proteínas *F-box* de plantas interaccionan con distintos miembros de la familia ASK, que en *Arabidopsis* comprenden 21 miembros (Risseuw *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004). Los datos obtenidos para SKP2A a partir del experimento de doble híbrido, muestran que es capaz de interaccionar con ASK1 y ASK2, y en menor

medida con ASK18, mientras que no lo hace con ASK6, ASK8, ASK10 o ASK14. Esto indicaría que SKP2A podría estar formando parte de distintos tipos de complejos SCF de forma específica. En humanos se conoce que SKP2 forma un complejo con CUL1, pero también con CUL4A-DDB1 para ubiquitinar al inhibidor de p27 (Bondar *et al.*, 2006). Nuestros resultados han mostrado que SKP2A también forma un complejo con CUL1 y ASK1 *in vivo*. En plantas, también se han identificado proteínas homólogas a CUL4A y DDB1 (Bernhardt *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006), por lo que es posible que SKP2A interaccione con ellas. Esta posibilidad será estudio en el futuro de otros trabajos.

En Arabidopsis existen más de 700 proteínas *F-box* distintas, pero se desconoce si todas codifican para E3 ligasas (Moon y Estelle, 2004). En los últimos años, han sido identificadas diferentes E3 involucradas en distintos aspectos del desarrollo de las plantas (Moon *et al.*, 2004; Smalle y Viestra, 2004; Somers *et al.*, 2009). Se ha podido comprobar *in vitro* la actividad ubiquitina ligasa de alguna de estas E3 con dominio RING y HECT (Dong *et al.*, 2006; Kraft *et al.*, 2005), pero hasta la fecha no se había mostrado actividad bioquímica para ningún SCF de plantas. En este trabajo se ha desarrollado un sistema *in vitro* que nos ha permitido comprobar que SKP2A tiene la capacidad de ubiquitinar proteínas. El complejo SCF^{SKP2A} muestra altos niveles de actividad cuando se incuba en presencia de UBC8, más que con otras E2 de Arabidopsis, lo que sugiere que UBC8 y SKP2A pudieran estar funcionando en conjunto para favorecer la ubiquitinación de las proteínas diana. Asimismo, el desarrollo de este sistema de ubiquitinación *in vitro* permitirá analizar en un futuro la ubiquitinación específica de proteínas diana, y poder analizar así los dominios de interacción necesarios entre la proteína *F-box* y la diana.

Regulación de SKP2A

La regulación de SKP2A parece llevarse a cabo a dos niveles. Un primer nivel es el transcripcional, ya que *SKP2A* se expresa diferencialmente a lo largo del ciclo celular, y fuertemente en áreas en división. Un segundo nivel sería el postraducciona, ya que la proteína MYC-SKP2A se degrada a través de la ruta UPS y se modifica con ácido N-mirístico. La modificación con ácido N-mirístico ha sido asociada a la interacción con la membrana plasmática o a la interacción proteína-proteína. El hecho de que la proteína MYC-SKP2A se miristile puede estar relacionado con su capacidad

para interaccionar con sus posibles dianas u otras proteínas. En humanos, *SKP2* también está regulado por diferentes mecanismos: a nivel de la transcripción (Lisztwan *et al.*, 1998; Michel y Xiong, 1998), por acetilación, y por ubiquitinación para su degradación vía UPS mediante la función del complejo APC (Cdh1) (Wirbelauer *et al.*, 2000; Bashir *et al.*, 2004). La degradación de proteínas *F-box* por la ruta ubiquitina/proteasoma 26S, se ha descrito en trabajos previos en levaduras (Galan y Peter, 1999). Estos autores proponen que la degradación de proteínas *F-box* puede actuar como un mecanismo rápido de desactivación de los complejos SCF. Los tratamientos de plántulas MYC-SKP2A^{OE} con auxina muestran menores niveles de la proteína MYC-SKP2A. Asimismo, experimentos de ubiquitinación *in vitro* con plántulas que fueron tratadas durante 4 horas con auxina muestran un incremento de proteínas ubiquitinadas en el ensayo. Todos estos datos en conjunto sugieren que las auxinas podrían estar incrementando la transcripción del gen *SKP2A*, estimulando la actividad E3 ligasa del complejo SCF^{SKP2A} y la degradación de la proteína MYC-SKP2A.

Como ya se ha comentado, la proteína SKP2A se regula por ubiquitinación y degradación vía UPS. El mutante *axr1-12* es incapaz de modificar el componente estructural del complejo SCF, CUL1. Esta mutación afecta severamente a la degradación de los factores IAA/Aux por parte de TIR1 y a las proteínas relacionadas AFBs (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski *et al.*, 2005). Es interesante remarcar que en este trabajo se ha observado que MYC-SKP2A se acumula en el mutante *axr1-12*. La acumulación observada puede deberse a que el mutante responde menos a las auxinas, o a que la E3 encargada de degradar a MYC-SKP2A necesita la forma modificada CUL1-RUB1 para ser funcional. Asimismo, otra posibilidad es que en el mutante la proteína SKP2A no pueda ensamblarse correctamente en un complejo SCF^{SKP2A} y por lo tanto no pueda degradarse, es decir, la isoforma que no esté formando un complejo SCF no se degrada efectivamente. Así, con los datos actuales, las tres posibilidades pueden ser ciertas, y por ello es necesario realizar más experimentos para poder discernir la correcta. Nosotros nos inclinamos más a pensar que SKP2A no forma un complejo SCF funcional en el mutante, ya que los niveles del factor transcripcional E2FC se acumulan también en *axr1-12*/MYC-SKP2A^{OE}, lo que indica que MYC-SKP2A es incapaz de proceder a su degradación. Esto sugiere que la forma que se degrada es la que está formando el complejo SCF. En la bibliografía encontramos que la auxina está involucrada en la estabilización de un miembro de la familia de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas, ICK1/KRP1. Este inhibidor se regula también a través

de la vía UPS y su degradación está mediada por las E3 ligasas SKP2B y RKP. ICK1/KRP1 interacciona con los complejos CDKA₁/CYCD2;1 y está involucrado en la transición G1-S del ciclo celular (Ren *et al.*, 2008). En células de tabaco BY2, también se ha comprobado que la auxina está involucrada en la estabilización de E2FB, un factor transcripcional que promueve la división celular (Magyar *et al.*, 2005). Asimismo, E2FB se degrada a través del sistema UPS. Por ello, es fácil pensar que la conexión entre la respuesta a auxina y la división celular esté regulada a través de la degradación selectiva de la proteína vía UPS. Por lo tanto, será de gran interés analizar en el futuro si E2FB es regulado por SKP2A o SKP2B.

Por otro lado, se ha encontrado que otros mutantes de respuesta a auxina acumulan menos cantidad de proteína MYC-SKP2A. El mutante *tir1-1*, que tienen afectado el receptor de auxinas, los mutantes *axr2* y *axr3*, que son represores Aux/IAA, y el mutante *aux1-7*, que tiene alterado el transporte de auxinas, acumulan niveles menores de MYC-SKP2A. Una posible explicación para la reducción de MYC-SKP2A en estos mutantes sería el incremento de la síntesis de auxina para intentar aumentar su capacidad de respuesta a la hormona, y que fueran estos mayores niveles de auxina los responsables de la degradación de MYC-SKP2A. Sin embargo, los niveles de auxinas en estos mutantes todavía no se han analizado.

El tratamiento con Terfestatina A (TrfA), provoca una gran acumulación de MYC-SKP2A en las plantas. La TrfA ha sido descrita como un bloqueante de la respuesta a auxina (Yamazoe *et al.*, 2005), que favorece la acumulación de los factores Aux/IAA. En la raíz, el uso de TrfA inhibe el crecimiento de la raíz principal, favorece la iniciación de las raíces laterales y de los pelos radiculares, así como el gravitropismo. Estos datos indican que tanto los niveles como la respuesta a las auxinas están relacionados con la estabilidad de MYC-SKP2A.

SKP2A juega un importante papel en el crecimiento de la planta en condiciones ambientales limitantes

El crecimiento de las plantas depende del balance entre la división celular de los meristemas y la posterior expansión de las células diferenciadas. Este crecimiento está regulado por la interconexión funcional de distintas fitohormonas (auxina, citoquinina, ABA, etc.), y de nutrientes como la sacarosa, el fosfato o el nitrato, entre otros. La percepción de un estrés involucra a diferentes tipos de componentes, muchos de los

cuales se desconoce su funcionamiento a nivel molecular. En este trabajo se ha observado que las plantas que sobreexpresan MYC-SKP2A crecen más que las silvestres. Por ello, se decidió analizar el efecto en el crecimiento y desarrollo que producían en estas plantas distintos tipos de estreses abióticos.

Uno de los nutrientes más importantes en el medio terrestre es el fosfato. El déficit de fosfato conlleva importantes cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas, como son la reducción de la parte aérea y el incremento del sistema radicular (la raíz principal se acorta, pero se aumenta el número de raíces laterales) o el incremento de antocianinas. Estudios previos han indicado que esta reducción de la raíz principal es consecuencia de la disminución de la elongación y de la división celular (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). En los estudios realizados con plantas MYC-SKP2A^{OE} se ha observado, que creciendo las plantas en un medio completo, existe un aumento en el tamaño foliar y en el número de células en división en los meristemos. En ausencia de fosfato, las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A mostraban división celular en meristemos radiculares durante más tiempo que las silvestres, así como mayor cantidad de biomasa. Esta mayor tasa no se debe a que las plantas MYC-SKP2A^{OE} acumulen más Pi, ya que la cuantificación de este nutriente en las plantas sobreexpresoras y mutantes mostraron niveles similares. Por ello es muy probable que la sobreexpresión de MYC-SKP2A promueva el crecimiento de la planta incluso en condiciones limitantes de fosfato en el medio por ser un regulador positivo de la división celular.

En *Arabidopsis*, altos niveles de sacarosa en el medio inhiben la expansión de los cotiledones, y afecta también a la formación de hojas y raíces (Gibson, 2005). Los estudios realizados con plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A y *skp2a* crecidas en medio MS con distintas concentraciones de sacarosa, muestran que estas plantas tienen una mayor supervivencia que las plantas control. Los experimentos realizados con manitol, para eliminar el efecto de la sacarosa como fuente de carbono, dieron lugar al mismo resultado. Estos datos sugieren un papel relevante de MYC-SKP2A en condiciones de estrés osmótico. Este resultado es interesante ya que parece relacionar la función de un gen de división celular con la resistencia al estrés. Por ello, analizamos si SKP2A también podía estar involucrado en la resistencia/tolerancia a otro tipo de estreses. Así encontramos que la sobreexpresión de MYC-SKP2A confiere mayor capacidad de supervivencia frente a las altas temperaturas que las plantas silvestres. Una posible explicación de estos resultados es que la sobreexpresión de MYC-SKP2A mantiene la división celular activa durante más tiempo, lo que se traduce en un

crecimiento más efectivo en estas condiciones de crecimiento limitantes. Por otro lado, estos estreses pueden eliminar la capacidad de división de los meristemos, con lo que las plantas una vez finalizado el estrés, no son capaces de seguir creciendo. Así, es posible que la sobreexpresión de MYC-SKP2A mantenga activos los meristemos y permita su crecimiento posterior. Por otro lado, también se ha encontrado que el mutante *skp2a* presenta una tolerancia a estos estreses algo menor que las plantas MYC-SKP2A^{OE}, pero significativamente mayor que las plantas silvestres. Este fenotipo podría explicarse si la supresión de la función de *SKP2A* indujera la expresión de una proteína que puede tener una función similar a la de *SKP2A*, siendo este gen el responsable del fenotipo observado.

Es muy interesante remarcar que las plantas MYC-SKP2A^{OE} y *skp2a* son más sensibles al ABA. Esta hormona ejerce un efecto inhibitorio del desarrollo, bloqueando la división celular en la fase S e impidiendo la replicación del ADN (Yang *et al.*, 2002). Esto se debe a que estimula la producción de los inhibidores de CDKs, KRP1, que se unen a los complejos CycD/CDK bloqueando su función e impidiendo la progresión hacia la fase S (Wang, *et al.*, 1998). El ABA parece también ejercer una represión directa en algunos genes reguladores del ciclo celular, como *CDKA* (Smalle *et al.*, 2003) o genes de replicación del ADN, como *CDT1* (Castellano *et al.*, 2004), topoisomerasa I (Jain *et al.*, 2008) o telomerasas (Yang *et al.*, 2002). Las plantas mutantes de *skp2a* presentan una gran sensibilidad al ABA exógeno a 13d (figura 23c). Ya que las plantas *skp2a* acumulan mayores niveles de los factores transcripcionales E2FC/DPB (del Pozo *et al.*, 2006), sería posible que el efecto aditivo de la mutación *skp2a* y el ABA se deba a una mayor acumulación de E2FC/DPB, represores de la división celular. En el caso de la sobreexpresión de MYC-SKP2A, es posible que SKP2A actúe incrementando la sensibilidad a ABA mediante la degradación de reguladores que potencian el efecto final de esta hormona.

SKP2A es un nuevo receptor de auxinas

Hasta este momento sólo se habían descrito dos tipos diferentes de proteínas con capacidad para unir auxinas, ABP1 y TIR1 (Woo *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2007; Bertosa *et al.*, 2008). Los resultados presentados en este trabajo aportan pruebas convincentes de que la proteína SKP2A, pero no su homólogo de secuencia SKP2B, une auxinas. Los datos proporcionados por el cristal de TIR1 han permitido identificar todos los residuos implicados en la unión a auxinas (Tan *et al.*, 2007). Gracias a los análisis de superposición de las proteínas TIR1 y SKP2A y al acoplamiento del sitio de unión, se ha podido identificar un sitio de unión a auxinas en SKP2A. Comparando el modelo de TIR1 con el de SKP2A, se observa que, aunque los lugares de unión a auxina son distintos, conservan multitud de similitudes en las interacciones que realizan con la auxina:

- En ambos casos el grupo carboxilo ancla a la auxina formando 2 puentes de hidrógeno con dos residuos cercanos (R403 y S438 en TIR1, y S127 y N149 en SKP2A).
- El grupo NH del anillo indólico de la auxina también forma 2 puentes de hidrógeno en TIR1 y SKP2A con los oxígenos de otros dos residuos (L404 y L439 en TIR1, y C177 y S151 en SKP2A).
- Además, en los dos modelos existe un residuo con la orientación que permitiría un puente de hidrógeno O-H $\cdots\pi$ con la nube π del anillo fenólico de la auxina (S462 en TIR1 y N202 en SKP2A) (Tan *et al.*, 2007).

Como se ha comentado anteriormente, SKP2B, a pesar de su alta homología con SKP2A, no une auxinas. Comparando en las secuencias de las dos proteínas los posibles residuos que pudieran estar implicados en esta unión, sólo la leucina en la posición 128 es diferente. Esto hace pensar que este residuo, L128, pudiera ser clave para la unión de la auxina. Al realizar una mutagénesis en SKP2A, convirtiendo la L128 en una serina (residuo que aparece en la secuencia de la proteína SKP2B en la misma posición) la capacidad de unión de la auxina a la MBP-SKP2A[L128S] se ve reducida en un 60%, confirmando que L128 es clave para la unión a auxinas. De hecho, esta L128 forma una pared apolar que favorece la interacción hidrofóbica con el anillo aromático de la auxina, y permite la correcta formación de un hueco, con un potencial electrostático neutro, donde la auxina reposaría. Sin embargo, la S128 presente en SKP2B es un residuo polar con poca superficie que no forma una pared en el hueco de unión a auxina.

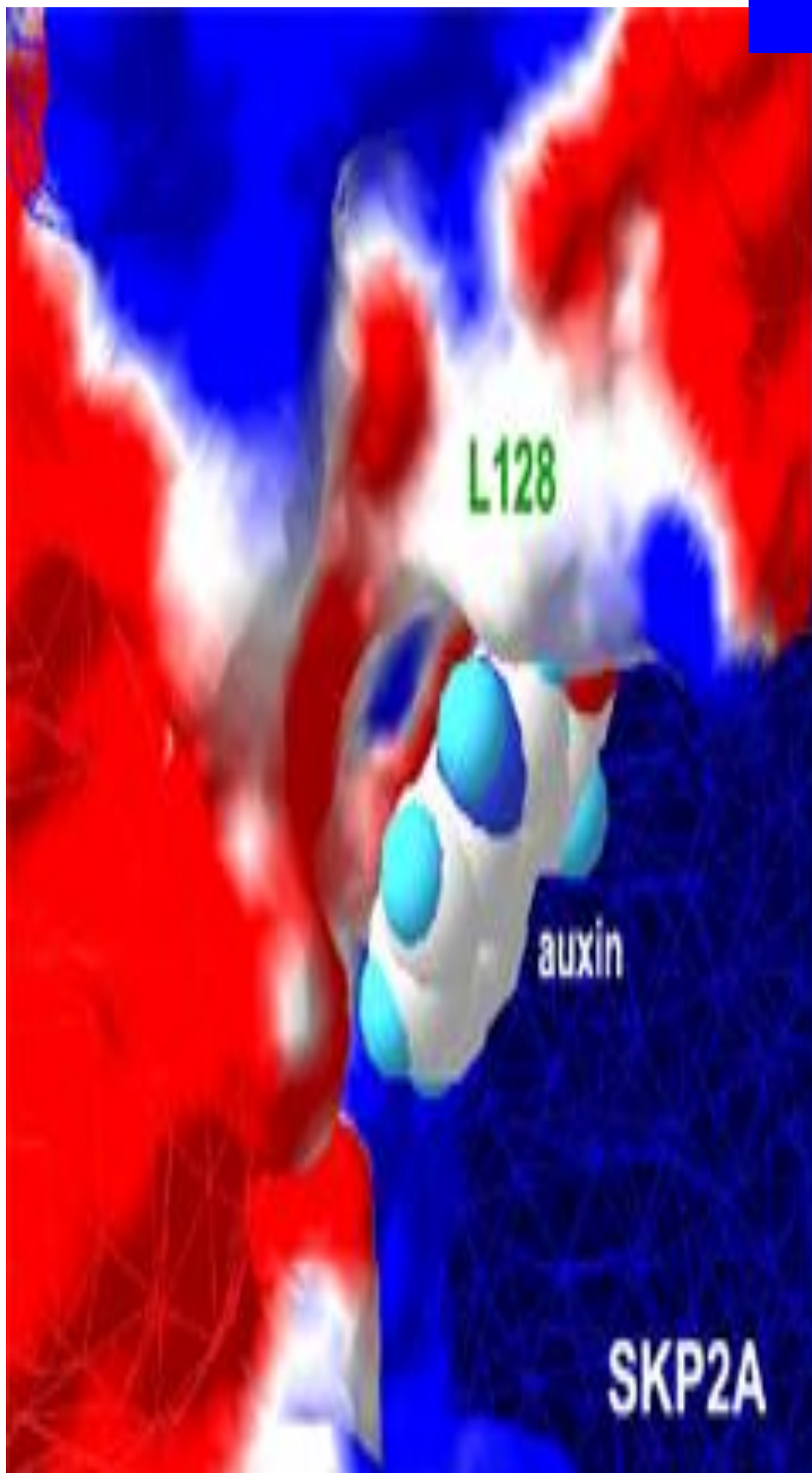
Las respuestas a auxinas en plantas son muy numerosas, por lo que es probable que todavía no se hayan descrito todas las proteínas implicadas en procesos específicos de la señalización de auxinas. En este caso, la proteína SKP2A podría servir como nexo de unión entre la auxina y la división celular (del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008). A partir de estos datos parece lógico pensar que SKP2A sea un nuevo receptor de auxinas. Los receptores de auxina TIR1 y TIR1-like, median la rápida degradación de los Aux/IAA, liberando la función de los factores transcripcionales ARF que inducen la expresión de los genes regulados por auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski *et al.*, 2005). La auxina se une a estos receptores sin producir ningún cambio conformacional en ellos (Tan *et al.*, 2007), descartando que la auxina funcione como un regulador alostérico, si no estimulando la interacción del complejo SCF^{TIR1} y los Aux/IAA de forma directa, actuando como un pegamento molecular (Dharmasiri *et al.* 2005; Kepinsky *et al.*, 2005; Bishopp *et al.* 2006; Tan *et al.*, 2007). En nuestro caso, es probable que la auxina se una a SKP2A, estimulando o bloqueando la interacción con sus dianas. En la actualidad, hay descritos dos factores transcripcionales del ciclo celular, E2FC y DPB regulados por SKP2A (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008). Experimentos de *pull-down* en presencia de auxina no parece interferir en la unión entre SKP2A y DPB, por lo menos en condiciones *in vitro* (Abraham y del Pozo, datos no publicados). Sin embargo, se puede por ello descartar que la auxina no interfiera con la unión de SKP2A a otras proteínas diana. Otra posibilidad, que creemos más probable, es que la auxina se una a la proteína SKP2A y actúe como una señal que promueva su degradación a través del sistema UPS. En muchos casos, las proteínas diana deben ser modificadas postraduccionalmente (“*etiquetadas*”) para poder ser reconocidas por las E3 y degradadas. Algunas de estas modificaciones postraduccionales descritas son fosforilaciones, hidroxilaciones o glicosilaciones, entre otras (Ravid *et al.*, 2008). En el caso de SKP2A creemos que la auxina podría actuar como etiqueta. Para demostrar esta hipótesis, se van a llevar a cabo ensayos de degradación sobre diferentes mutantes de SKP2A que unen o no auxinas.

Nuestros datos, muestran claramente que MYC-SKP2A se degrada en respuesta a las auxinas. Sin embargo, el complejo SCF^{TIR1} no parece ser el responsable de la proteólisis de SKP2A. Desconocemos por el momento la E3 implicada en la degradación de SKP2A, aunque no descartamos que sea la propia SKP2A la que se autoubiquitine, ya que hay muchos ejemplos de enzimas E3 con dominio RING que presentan esta capacidad de autoubiquitinación, como es el caso de las proteínas de

Arabidopsis XBAT32 y RMA1, o de las Nrdp1 y TRAF6, de humanos (Wu *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2000; Lamothe *et al.*, 2007). En el genoma de Arabidopsis existen más de 700 *F-box*, de las cuales, más de 300 poseen motivos LRRs. En el futuro será muy interesante analizar si estas *F-box* se regulan por degradación selectiva a través del sistema UPS. Por otro lado, en nuestro grupo han sido identificadas varias proteínas *F-box* que poseen una homología significativa con SKP2A y que poseen varios, aunque no todos, de los residuos implicados en la unión a auxina. Experimentos futuros nos revelarán si estas *F-box* también son capaces de unir a esta hormona y de degradarse vía UPS.

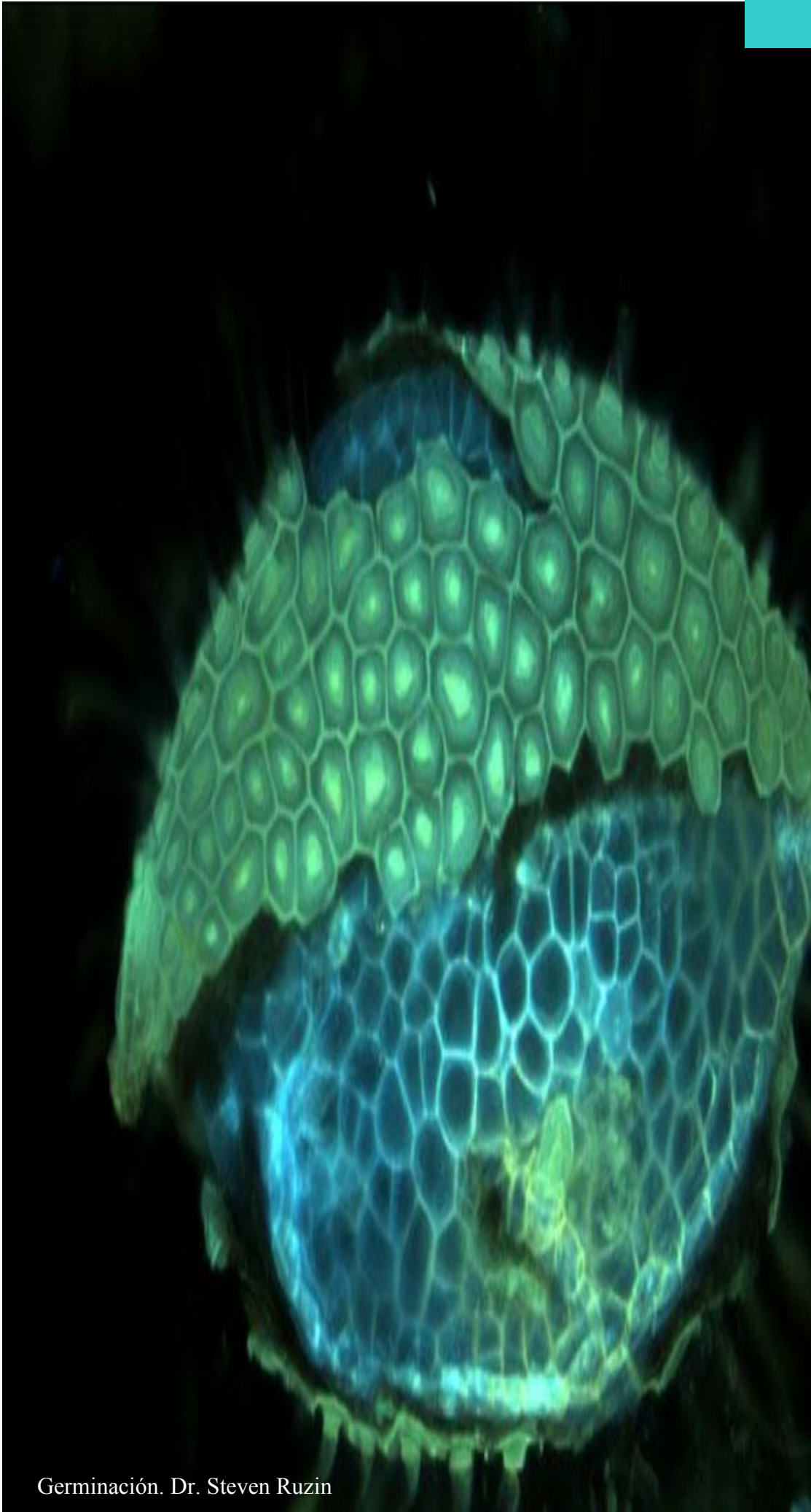
En la actualidad, se han descrito también varios ejemplos de proteínas con dominios LRR capaces de unirse a otras fitohormonas, como COI1 con capacidad de unir a jasmónico de forma directa (Katsir *et al.*, 2008) o del receptor BRI1, con capacidad de unión a brasinoesteroides (Kinoshita *et al.*, 2005). Por ello, cabe la posibilidad de que existan otras proteínas de tipo *F-box* con secuencias LRR que tengan capacidad de unir hormonas o pequeñas moléculas o metabolitos, y que no hayan sido descritas todavía.

En este trabajo se ha encontrado una conexión directa a nivel molecular entre la auxina, una hormona que regula la división celular, y una *F-box* implicada en el control de la proliferación celular. Este resultado tiene un doble valor ya que hasta la fecha se desconoce cómo la auxina actuaba a nivel molecular para regular la división celular, y por otro lado, el hecho de que SKP2A una directamente auxinas, abre la puerta a que otras *F-box* sean capaces de interaccionar directamente con fitohormonas o pequeñas moléculas reguladoras para controlar el crecimiento, el desarrollo y las respuestas de las plantas a estímulos externos.



- ✓ SKP2A es una proteína nuclear que se modifica post-traducionalmente
- ✓ La expresión de *SKP2A* se regula a nivel de ciclo celular. Asimismo, se expresa diferencialmente en los diferentes órganos, siendo más intensa en áreas de división.
- ✓ *SKP2A* es un gen regulador positivo del ciclo celular y su sobreexpresión aumenta el número de células en fase G2/M en los meristemos.
- ✓ Las plantas que sobreexpresan MYC-SKP2A acumulan menos cantidad de la proteína E2FC, y tienen niveles menores de ploidía que las plantas silvestres, ya que SKP2A está degradando E2FC *in planta*.
- ✓ La sobreexpresión de MYC- SKP2A da lugar a plantas con mayor tamaño y mayor biomasa y promueve el desarrollo del sistema radicular de forma dependiente de auxinas.
- ✓ La sobreexpresión de MYC-SKP2A promueve el crecimiento en condiciones de ausencia de fosfato.
- ✓ Las plantas sobreexpresoras de MYC-SKP2A presentan una mayor supervivencia en condiciones estrés osmótico.
- ✓ La sobreexpresión de MYC-SKP2A confiere mayor capacidad de supervivencia frente a las altas temperaturas.
- ✓ SKP2A forma parte de un complejo SCF^{SKP2A} que tiene actividad ubiquitín-ligasa E3.
- ✓ SKP2A se ubiquitina y se regula por degradación vía ubiquitina/proteasoma 26S.

- ✓ La estabilidad de la proteína MYC-SKP2A, y por tanto su función, parecen ser dependientes de la correcta homeostasis de la respuesta a auxina.
- ✓ MYC-SKP2A se degrada por efecto directo de las auxinas, pero el complejo SCF^{TIR1} no parece ser el responsable de la proteólisis.
- ✓ La proteína SKP2A actúa como receptor de auxinas.



Akihiro, T., Mizuno, K., Fujimura, T. (2005) Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant Cell Physiol*, **46**, 937-946.

Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C.I. (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot (Lond)*, **97**, 883-893.

Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T.P., Steber, C.M. (2008) Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell*, **20**, 2447-2459.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. Schwede, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, **22**, 195-201 (2006).

Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T., Eisenhaber, F. (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci.* **6**, 463-470.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037-10041.

Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*, **428**, 190-193.

Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T., Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **134**, 1624-1631.

Barroco, R.M., De Veylder, L., Magyar, Z., Engler, G., Inze, D., Mironov, V. (2003). Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci* **60**: 401–412.

Baulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, M.A., Harrison, B.D. (1986). Expression of biologically active viral satellite ARN from the nuclear genome of transformed plants. *Nature*. **32**:446-457

Beeckman, T., Burssens, S., Inze, D. (2001) The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *J Exp Bot*, **52**, 403-411.

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., Jurgens, G., Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**, 591–602.

Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B. Feldmann, K.A. (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-950.

Bennett, R.N., Wenke, T., Freudenberg, B., Mellon, F.A. and Ludwig-Muller, J. (2005) The tu8 mutation of *Arabidopsis thaliana* encoding a heterochromatin protein 1 homolog causes defects in the induction of secondary metabolite biosynthesis. *Plant Biol (Stuttg)*, **7**, 348-357.

Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., Hellmann, H. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*.

Bertosa, B., Kojic-Prodic, B., Wade, R. C., Tomic, S. (2008). Mechanism of auxin interaction with Auxin Binding Protein (ABP1): a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* **94** (1), 27.

Binder, B.M., Walker, J.M., Gagne, J.M., Emborg, T.J., Hemmann, G., Bleecker, A.B., Vierstra, R.D. (2007) The *Arabidopsis* EIN3 binding *F-box* proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, **19**, 509-523.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. *Nucleic acids research*, **7**, 1513-1523.

Bishopp, A., Mahonen, A.P. and Helariutta, Y. (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development*, **133**, 1857-1869.

Bleecker, A.B. (1991) Genetic analysis of ethylene responses in *Arabidopsis thaliana*. *Symp Soc Exp Biol*, **45**, 149-158.

Bondar, T., Kalinina, A., Khair, L., Kopanja, D., Nag, A., Bagchi, S., y Raychaudhuri, P. (2006). Cul4A and DDB1 associate with Skp2 to target p27Kip1 for proteolysis involving the COP9 silenosome. *Mol. Cell Biol.* **26**, 2531-2539.

Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*, **28**, 341-350.

Boonsirichai, K., Guan, C., Chen, R. y Masson, P.H. (2002). Root gravitropism: an experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 421-447.

Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inze, D. and De Veylder, L. (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2683-2692.

Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448

Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48-54

Bray, E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Gruissen W. Buchanan B., Jones R. (Eds.), *Biochemistry y molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD; pp 1158-1249.

Casal, J.J. (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol*, **71**, 1-11.

Case, D.A., Cheatham, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. & Woods, R. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668-1688 (2005).

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M. (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, **13**, 843-852.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M.J. (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci*, **8**, 165-171.

Castellano Mdel, M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A. and Gutierrez, C. (2004) DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell*, **16**, 2380-2393.

Chen H., Shen Y., Tang, X., Yu, L., Wang J., Guo, L., Zhang, Y., Zhang, H., Feng, S., Strickland, E., Zheng, N., Deng, X. (2006) *Arabidopsis* CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *Plant Cell*

Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, **55**, 225-236.

Chory, J. (1993) Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet*, **9**, 167-172.

Clarkson, T.W., Nordberg, G.F., Sager, P.R. (1985) Reproductive and developmental toxicity of metals. *Scand J Work Environ Health*, **11**, 145-154.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-43.

Coates, J.C., Laplaze, L., Haseloff, J. (2006). Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1621-1626.

Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P. (1999). Spatiotemporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**, 503-508.

Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.C., Abel, S. (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol*, **124**, 1728-1738.

Creelman, R.A., Gage, D.A., Stults, J.T. and Zeevaart, J.A. (1987) Absciscic Acid Biosynthesis in Leaves and Roots of *Xanthium strumarium*. *Plant Physiol*, **85**, 726-732.

Dapprich, S., Komáromi, I., Byun, K.S., Morokuma, K. Frisch, M.J. A new ONIOM implementation in Gaussian. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **462**, 1-21 (1999).

David, K.M., Couch, D., Braun, N., Brown, S., Grosclaude, J., Perrot-Rechenmann, C. (2007) The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *Plant J*, **50**, 197-206.

Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Hellmann, H., Estelle, M. (2003) The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in *Arabidopsis*. *EMBO J*, **22**, 1762-1770.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., Estelle, M. (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell*, **9**, 109-119.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The *F-box* protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441-445.

Deng, X.W. (1994) Fresh view of light signal transduction in plants. *Cell*, **76**, 423-426.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. **103**:351–361.

Devoto, A. y Turner, J.G. (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *arabidopsis*. *Ann Bot (Lond)*, **92**, 329-337.

Dewitte, W. & Murray, J.A. (2003). The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 235–264.

De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H. y Zhang, H. (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J*, **33**, 543-555.

De Smet, I., Vanneste, S., Inze, D. and Beeckman, T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* **60**, 871–887.

De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, **134**, 681–690.

De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van der Schueren, E., Inze, D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653-68.

De Veylder, L., Beemster, G.T., Beeckman, T., Inze, D. (2001) CKS1At overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J*, **25**, 617-626.

De Veylder, L., Beeckman, T., Inze, D. (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 655-665.

del Pozo, J.C., Timppte, C., Tan, S., Callis, J., Estelle, M. (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science*, **280**, 1760-1763.

del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., Gutierrez, C. (2002). Arabidopsis E2FC functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**, 3057-71.

del Pozo, J.C., Diaz-Trivino, S., Cisneros N., Gutierrez C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF^{SKP2A} pathway. *Plant Cell*. **18**, 2224-2235.

del Pozo, J.C., Estelle, M. (2000). *F-box* proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Mol Biol*. **44**, 123-8.

Dehan, E., Pagano, M. (2005). Skp2, the FoxO1 hunter. *Cancer Cell*. **7**(3), 209-10.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, Palo Alto, California, USA (2008). <http://www.pymol.org>

Devoto, A., Muskett, P.R., Shirasu, K. (2003). Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol*. **6**, 307-11.

Dharmasiri, S. and Estelle, M. (2002) The role of regulated protein degradation in auxin response. *Plant Mol Biol*, **49**, 401-409.

Do, C.B. y Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions *Plant Cell Rep.* **9**, 143-146.

Doherty, F.J., Dawson, S., Mayer, R.J. (2002). The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays Biochem*. **38**, 51-63. Review.

Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res*. **32**, W776-W767 (2004).

Dong, C-H, Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. y Zhu, J-K. (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **103**, 8281-8286.

Enders, G.H., Maudes, S.L. (2006). Traffic safety for the cell: influence of cyclin-dependent kinase activity on genomic stability. *Gene*. **371**(1):1-6.

Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J. y Koncz, C. (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J*, **20**, 2742-2756.

Fedoroff, N.V. (2002) Cross-talk in abscisic acid signaling. *Sci STKE*, **2002**, RE10.

Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N. and Deng, X.W. (2003) The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell*, **15**, 1083-1094.

Ferro, N., Bultinck, P., Gallegos, A., Jacobsen, H.J., Carbo-Dorca, R. y Reinard, T. (2007) Unrevealed structural requirements for auxin-like molecules by theoretical and experimental evidences. *Phytochemistry*, **68**, 237-250.

Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. and Rock, C.D. (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S15-45.

Frisch, M.J. Gaussian 03. Revisions C.02 and D.01. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA (2004).

Fleet, C.M. and Sun, T.P. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 77-85.

Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P. and Blazquez, M.A. (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **142**, 553-563.

Fu, X. y Harberd, N.P. (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, **421**, 740-743.

Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. y Tasaka, M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J*, **29**, 153-168.

Fukaki, H. and Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol*, **69**, 437-449.

Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S-H., Durski, A.M., Vierstra, R.D. (2002). The *F-box* subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11519-24

Galan, J.M., y Peter, M. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of multiple *F-box* proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9124-9129.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Jefferson, R.A. (1988). Flow cytometric characterization of the chlorophyll contents and size distributions of plant protoplasts. *Cytometry*. **9**(1), 75-83.

Gibson, S.I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol*. **8**(1), 93-102. Review.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. y Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-ADN/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.

Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. y Yoshida, S. (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **134**, 1555-1573.

Gomez-Campo, C. (1976). Conservation techniques of crucifer seeds banks. *Arabid. Info. Serv.* **13**, 18-21.

Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. y Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **13**, 1678–1691.

Guex, N. Peitsch, M.C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723 (1997).

Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T. y Hagen, G. (1998) The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 619-627.

Guo, Z.J., Chen, X.J., Wu, X.L., Ling, J.Q., Xu, P. (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol.***55**(4):607-18.

Hamann, T., Benkova, E., Baurle, I., Kientz, M. y Jurgens, G. (2002) The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev*, **16**, 1610-1615.

Hartwell, L.H. y Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.

Hasegawa, T., Noda, K., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A. y Yoshikai, Y. (2000) Chlorella vulgaris culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. *Int J Immunopharmacol*, **22**, 877-885.

Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18**: 6744–6751

Hellmann, H., Estelle, M. (2002). Plant development: regulation by protein degradation. *Science*. **297**(5582), 793-7. Review.

Hengst, L. (2004) A second RING to destroy p27(Kip1). *Nat Cell Biol*, **6**, 1153-1155.

Hershko A, Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.

Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inze, D. y Beeckman, T. (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, **14**, 2339-2351.

Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercruysse, S., Boucheron, E., Alard, P., Chriqui, D., Van Montagu, M., Inze, D. y Beeckman, T. (2004) Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5146-5151.

Ingram, J., Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol* **47**:377–403

Ingber, A. (2003). Breaking the rules of topical skin therapeutics. *Skinmed*, **2**, 181.

Inze,D. and De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 77–105.

Jackson, M.L. (1958). Soil chemical analysis. Englewood. NJ: Prentice-Hall. 662.

Jackson, P.K., y Eldridge, A.G. (2002). The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol Cell.* **9**, 923-925.

Jain, M., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. (2008) Constitutive expression of a meiotic recombination protein gene homolog, OsTOP6A1, from rice confers abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep*, **27**, 767-778.

Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Cashmore, A.R. (2001) An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, **410**, 487-490.

Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C. y Glab, N. (2002) Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiol*, **130**, 1871-1882.

Jones, J., Wu, K., Yang, Y., Guerrero, C., Nillegoda, N., Pan, Z.Q. and Huang, L. (2008) A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins. *J Proteome Res*, **7**, 1274-1287.

Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inz'e, D., Umeda, M. Renaudi, J.P. (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**, 607–620.

Jurado, S., Diaz-Trivino, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C. y del Pozo, C. (2008) SKP2A, an *F-box* protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant J*, **53**, 828-841.

Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe GA. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* **105**:7100-7105.

Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., y Nakayama, K.I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10231-1026.

Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K. y Nakayama, K.I. (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol*, **6**, 1229-1235.

Kepinski, S. y Leyser, O. (2005) The Arabidopsis *F-box* protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.

Kierman, R.E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J.C., Lorca, T., Nakayama, K., y Benkirane, M. (2001). Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7956-7970.

Kim, H.J., Oh, S.A., Brownfield, L., Hong, S.H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D. y Nam, H.G. (2008) Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature*, **455**, 1134-1137.

Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. y Chory, J. (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433**, 167-171.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W. and Karssen, C.M. (1989) In Vivo Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Abscissic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **90**, 463-469.

Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., Callis, J. (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **139**(4), 1597-611.

Krek, W. (1998). Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*. **8**(1):36-42. Review.

Kurup, S., Runions, J., Kohler, U., Laplace, L., Hodge, S. and Haseloff, J. (2005) Marking cell lineages in living tissues. *Plant J*, **42**, 444-453.

Kutz, A., Muller, A., Hennig, P., Kaiser, W.M., Piotrowski, M. y Weiler, E.W. (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **30**, 95-106.

LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A. y Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, **11**, 847-862.

Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., Xia, R., Wu, Y., Guo, H. and Xie, Q. (2009) RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *Plant J*, **57**, 905-917.

Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG. (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem*. **282**:4102–4112.

Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, **221**, 1-4.

Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C. y Sussex, I.M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, **121**, 3303-3310.

Lauber, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., y Jurgens, G. (1997). The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol*. **139**, 1485-93.

- Levitt, J.** (1980). Chilling, freezing and high temperature stress. Responses of Plants to environmental Stress, vol 1. New York: Academic Press.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpfe, C., Lammer, D., Turner, J. y Estelle, M.** (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, **364**, 161-164.
- Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S. y Estelle, M.** (1996) Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J*, **10**, 403-413.
- Leyser, H.M.** (1998) Plant hormones. *Curr Biol*, **8**, R5-7.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., y Wu, X.** (2003). The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J. Biol. Chem.* **278**, 30854-30858.
- Li, X., Mo, X., Shou, H. y Wu, P.** (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **47**, 1112-1123.
- Lincoln, C., Britton, J.H. y Estelle, M.** (1990) Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**, 1071-1080.
- Liscum, E. y Reed, J.W.** (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol*, **49**, 387-400.
- Lisztwan, J., Marti, A., Sutterluty, H., Gstaiger, M., Wirbelauer, C. y Krek, W.** (1998). Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the *F-box* protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *EMBO J*, **17**, 368-383.
- Liu, J. y Kipreos, E.T.** (2000) Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol*, **17**, 1061-1074.
- Liu, Y., Wang, F., Zhang, H., He, H., Ma, L. y Deng, X.W.** (2008) Functional characterization of the Arabidopsis ubiquitin-specific protease gene family reveals specific role and redundancy of individual members in development. *Plant J*, **55**, 844-856.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J. y Herrera-Estrella, L.** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol*, **129**, 244-256.
- Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A. y Herrera-Estrella, L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 280-287.
- Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Perez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B. y Herrera-Estrella, L.** (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in Arabidopsis. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol*, **137**, 681-691.

Lopez-Molina, L. y Chua, N.H. (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **41**, 541-547.

Lopez-Molina, L., Mongrand, S. y Chua, N.H. (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4782-4787.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**, 165-178.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. y Solano, R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 1938-1950.

Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D. y Bogre, L. (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*, **17**, 2527-2541.

Malamy, J.E. y Benfey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124**, 33-44.

Malamy, J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ*, **28**, 67-77.

Mandadi, K.K., Misra, A., Ren, S., McKnight, T.D. (2009) BT2, a BTB protein, mediates multiple responses to nutrients, stresses, and hormones in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*.

Maraschin Fdos, S., Memelink, J., Offringa, R. (2009) Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J*, **59**, 100-109.

Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., y Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* **1**, 14-19.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004) Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *J Exp Bot*, **55**, 1843-1849.

Mas, P., Kim, W.Y., Somers, D.E., Kay, S.A. (2003). Targeted degradation of Toc1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **426**, 567-70.

Menges, M., y Murray, J.A. (2002). Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* **30**, 203-212.

Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W. and Murray, J.A. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J*, **41**, 546-566.

Meyerowitz, E.M. (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Genet*, **21**, 93-111.

Meyerowitz, E.M. (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, **56**, 263-269.

Michel, J.J. y Xiong, Y. (1998). Human CUL-1, but not other cullin family members selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A. *Cell Growth Differ.* **9**, 435–449.

Mishra, N.S., Tuteja, R. y Tuteja, N. (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys*, **452**, 55-68.

Moon, J., Parry, G., y Estelle, M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*. **16**, 3181-3195.

Moon, H., Chowrira, G., Rowland, O., Blacklock, B.J., Smith, M.A. y Kunst, L. (2004) A root-specific condensing enzyme from *Lesquerella fendleri* that elongates very-long-chain saturated fatty acids. *Plant Mol Biol*, **56**, 917-927.

Moustakas, D.T., Lang, P.T., Pegg, S., Pettersen, E.T., Kuntz, I.D., Broojimans, N. Rizzo, R.C. Development and Validation of a Modular, Extensible Docking Program: DOCK 5. *J. Comput. Aided Mol. Design*. **20**, 601-609 (2006).

Mukherjee, S. y Orth, K. (2008) Microbiology. A protein pupylation paradigm. *Science*, **322**, 1062-1063.

Muller, R., Mumberg, D. Y Lucibello, F. C. (1993). Signals and genes in the control of cell-cycle progresión. *Biochim Biophys Acta* **1155**(2),151-179.

Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. y Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J*, **17**, 6903-6911.

Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, **25**, 239-250.

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. **15**:473-497

Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B., y McLaughlin, S. (1997). Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* **5**, 985–989.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, **104**, 34-41.

Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M. y Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J*, **46**, 880-889.

Nakayama, K. (1998) Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays*, **20**, 1020-1029.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K., y Hatakeyama, S. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* **19**, 2069-2081.

Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpfe, C., Estelle, M. y Reed, J.W. (2000) AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol*, **123**, 563-574.

Napier, R. (2004) Plant hormone binding sites. *Ann Bot (Lond)*, **93**, 227-233.

Nelson, D., Lasswell, J., Rogó, LE., Cohen, MA., Bartel, B. (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell*. **101**,331-40.

Nodzon, L.A., Xu, W.H., Wang, Y., Pi, L.Y., Chakrabarty, P.K. y Song, W.Y. (2004). The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**, 996–1006.

Okamura, S., Miyasaka, K., y Nishi, A. (1973). Synchronization of carrot cell culture by starvation and cold treatment. *Exp. Cell Res.* **78**, 467-470.

Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. y Theologis, A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell*, **17**, 444-463.

Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. y Tasaka, M. (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 118-130.

Ouellet, F., Overvoorde, P.J. y Theologis, A. (2001) IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell*, **13**, 829-841.

Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. y Theologis, A. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **17**, 3282-3300.

Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L., y Tyers, M. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/*F-box* protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* **12**, 692-705.

Pavletich, N.P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, **287**, 821-828.

Pearce, D.W., Reid, D.M. and Pharis, R.P. (1991) Ethylene-Mediated Regulation of Gibberellin Content and Growth in *Helianthus annuus* L. *Plant Physiol*, **95**, 1197-1202.

Pekker, I., Alvarez, J.P. y Eshed, Y. (2005) Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell*, **17**, 2899-2910.

Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. y Harberd, N.P. (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev*, **11**, 3194-3205.

Perez-Torres, C.A., Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M. y Herrera-Estrella, L. (2008) Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell*, **20**, 3258-3272.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. Ferrin, T.E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612 (2004).

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503–533.

Pickett, F.B., Wilson, A.K. and Estelle, M. (1990) The aux1 Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol*, **94**, 1462-1466.

Rajakrishnan, V., Jayadeep, A., Arun, O.S., Sudhakaran, P.R. y Menon, V.P. (2000) Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: effect of curcumin and N-acetylcysteine. *J Nutr Biochem*, **11**, 509-514.

Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O. y Callis, J. (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell*, **13**, 2349-2360.

Ravid, T. and Hochstrasser, M. (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 679-690.

Reed, R.C., Brady, S.R. y Muday, G.K. (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **118**, 1369-1378.

Reed, J.W. (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, **6**, 420-425.

Ren, H., Santner, A., del Pozo, J.C., Murray, J.A. y Estelle, M. (2008) Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J*, **53**, 705-716.

Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M. (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**: 1003–1018.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-2110.

Risseeuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., y Crosby, W.L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J.* **34**, 753-767.

Rogg, L.E. y Bartel, B. (2001) Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Dev Cell*, **1**, 595-604.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. y Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 675-709.

Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M. y Leyser, O. (1998) Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. *Science*, **279**, 1371-1373.

Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.M., Dhruvakumar, S., Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J.* **17**, 4909-19

Rudnick, D. A., McWherter, C. A., Gokel, G. W., y Gordon, J. I. (1993). A du. *Enzymol.* **67**, 375-430

Rudnick, D. A., McWherter, C. A., Adams, S. P., Ropson, I. J., Duronio, R. J., y Gordon, J. I. (1990) *J. Biol. Chem.* **288**, 13370-13378

Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J. y Estelle, M. (1998) The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev*, **12**, 198-207.

Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., y Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 174-184.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H. and Zhang, H. (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis. *Plant J*, **28**, 655-662.

Skowrya, D., Craig, K.L., Tyres, M., Elledge, S.J., Harper, J.W. (1997). *F-box* proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. **91**(2), 209-19.

Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.

Shore, S.M., Byers, S.A., Maury, W. y Price, D.H. (2003) Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene*, **307**, 175-182.

Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Emborg, T.J., Babiychuk, E., Kushnir, S. and Vierstra, R.D. (2003) The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 965-980.

Smalle, J., y Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-590.

Schmidt, W., Tittel, J. y Schikora, A. (2000) Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *Plant Physiol*, **122**, 1109-1118.

Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M. y Pavletich, N.P. (2000) Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, **408**, 381-386.

Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizábal, I.M., Pascual-Ahuir, A., Prof., M., Ros, R., Montesinos, C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during SALT stress. *J. EXP. BOT.* **50**, 1023-1036.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Op. Plant Physiol.* **6**: 410-417

Smirnov, N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**:214-219

Somers, D.E. and Fujiwara, S. (2009) Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends Plant Sci*, **14**, 206-213.

Steiner, T. y Koellner, G. (2001) Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol*, **305**, 535-557.

Stepanova, A.N. and Alonso, J.M. (2005) Arabidopsis ethylene signaling pathway. *Sci STKE*, 2005, cm4

Stepanova, A.N. and Alonso, J.M. (2005) Ethylene signaling pathway. *Sci STKE*, 2005, cm3.

Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D. y Callis, J. (2006) KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **18**, 3415-3428.

Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., y Matsui M. (2004). Expression and interaction analysis of Arabidopsis Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol.* **45**, 83-91.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. y Zheng, N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640-645.

Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E. y Yamamoto, K.T. (2004) MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **16**, 379-393.

Tedesco, D., Lukas, J., y Reed, S.I. (2002). The pRBR-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev.* **16**, 2946-2957.

Thompson, M.M., Wills, A., McDermott, E., Crowther, M., Brindle, N. y Bell, P.R. (1996) An in vitro model of aneurysmal disease: effect of leukocyte infiltration and shear stress on MMP production within the arterial wall. *Ann N Y Acad Sci*, **800**, 270-273.

Tian, Q. y Reed, J.W. (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development*, **126**, 711-721.

Ticconi, C.A., Delatorre, C.A., y Abel, S. (2001). Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 963-972.

Ticconi, C.A., Delatorre, C.A., Lahner, B., Salt, D.E., Abel, S. (2004). *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J.* **37**(6), 801-14.

Timpfe, C., Wilson, A.K. y Estelle, M. (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics*, **138**, 1239-1249.

Tiryaki, I. and Staswick, P.E. (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol.* **130**, 887-894.

Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, **13**, 2809-2822.

Tiwari, S.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T. (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*, **15**, 533-543.

Tiwari, S.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*, **16**, 533-543.

Tomoda, K., Kubota, Y. y Kato, J. (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, **398**, 160-165.

Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H., y Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* **9**, 661-664.

Turner, J.G., Ellis, C. y Devoto, A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S153-164.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I. y Matsuoka, M. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, **437**, 693-698.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.

Ulmasov, P., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Plant Biology*, **96**(10): 5844-5849.

Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5844-5849.

Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J*, **19**, 309-319.

Vanneste, S., Maes, L., De Smet, I., Himanen, K., Naudts M., Inze, M. y Beeckman T. (2005). Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiol. Plant.* **123**, 139-146.

Vlach, J., Hennecke, S. y Amati, B. (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J*, **16**, 5334-5344.

Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G. y Deshaies, R.J. (1997) Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*, **278**, 455-460.

Wang, Q.M., Luo, X. y Studzinski, G.P. (1997) Cyclin-dependent kinase 6 is the principal target of p27/Kip1 regulation of the G1-phase traverse in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated HL60 cells. *Cancer Res*, **57**, 2851-2855.

Wang, S., Wu, J., Savas, L., Patwardhan, N. y Khan, A. (1998) The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol*, **29**, 1304-1309.

Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. y Fowke, L.C. (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J*, **24**, 613-623.

Wang, H., y Deng, X.W. (2003) . Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci.* **8**,172-8.

Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., Chaabouni, S., Latche, A., Pech, J.C. y Bouzayen, M. (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell*, **17**, 2676-2692.

Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2001). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* **560**:285–292

Wang, W.X., Barak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2003). Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from *Populus*. In: Vasil IK (ed) *Plant biotechnology 2000 and beyond*. Kluwer, Dordrecht, pp 439–443.

Watt, M. y Evans, J.R. (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol*, **121**, 317-324.

Wei, N., Chamovitz, D.A. y Deng, X.W. (1994) Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*, **78**, 117-124.

Weijers, D. y Jurgens, G. (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 32-37.

Weiss, M.S., Brandl, M., Suhnel, J., Pal, D y Hilgenfeld, R. (2001). More hydrogen bonds for the structural biologist. *Trends in Biochem. Sci.* **26**, 521-523

Wilkinson, C.R., Ferrell, K., Penney, M., Wallace, M., Dubiel, W., Gordon, C. (2000). Analysis of a gene encoding Rpn10 of the fission yeast proteasome reveals that the polyubiquitin-binding site of this subunit is essential when Rpn12/Mts3 activity is compromised. *J Biol Chem.* **275**(20):15182-92.

Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F. y Krek, W. (2000) The *F-box* protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *EMBO J*, **19**, 5362-5375.

Woo, E. J. et al. (2002). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *EMBO J* **21** (12), 2877

Woodward, A.W., Ratzel, S.E., Woodward, E.E., Shamoo, Y. y Bartel, B. (2007) Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol*, **144**, 976-987.

Woodward, C., Bemis, S.M., Hill, E.J., Sawa, S., Koshiba, T. y Torii, K.U. (2005) Interaction of auxin and ERECTA in elaborating Arabidopsis inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol*, **139**, 192-203.

Worley, C.K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A. y Callis, J. (2000) Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J*, **21**, 553-562.

Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C. y Carraway, K.L., 3rd (2004). Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol Cell Biol*, **24**, 7748-7757.

Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M. y Chua, N.H. (2002). SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature*, **419**, 167–170.

Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. y Xie, D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 1919-1935.

Yang, S.W., Jin, E., Chung, I.K. and Kim, W.T. (2002) Cell cycle-dependent regulation of telomerase activity by auxin, abscisic acid and protein phosphorylation in tobacco BY-2 suspension culture cells. *Plant J*, **29**, 617-626.

Yamazoe, A., Hayashi, K., Kepinski, S., Leyser, O. and Nozaki, H. (2005) Characterization of terfestatin A, a new specific inhibitor for auxin signaling. *Plant Physiol*, **139**, 779-789.

Yang, X., Lee, S., So, J.H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R. Hobbie, L., Estelle, M. (2004). The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF^{TIR1}. *Plant J*. **40**, 772–782.

Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z. and Xie, D. (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *Plant Cell*.

Zhang, H. y Forde, B.G. (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, **279**, 407-409.

Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. y Forde, B.G. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6529-6534.

Zhang, H. y Forde, B.G. (2000) Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J Exp Bot*, **51**, 51-59.

Zhao, Y. (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 16-22.

Zheng, J., Yang, X., Harrell, J.M., Ryzhikov, S., Shim, E.H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R. and Zhang, H. (2002a) CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell*, **10**, 1519-1526.

Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P. y Xiao, Z.X. (2002b) The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature*, **419**, 849-853.

Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S. y Fowke, L.C. (2003) Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana. *Planta*, **216**, 604-613.

Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev PlantBiol* **53**:247–73